

Université de Montréal

Caractérisation du décalage du cadre de lecture de la protéine ataxine-3

par

Martine Therrien

Département de Pathologie et Biologie cellulaire

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine,
département de Pathologie et Biologie cellulaire
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences
en Pathologie et Biologie cellulaire
option système nerveux

Novembre 2011

© Martine Therrien, 2011

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Caractérisation du décalage du cadre de lecture de la protéine ataxine-3

Présenté par :
Martine Therrien

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Graziella Di Cristo, présidente-rapporteure
Guy Rouleau, directeur de recherche
Léa Brakier Gingras, membre du jury

Résumé en français

Les expansions du codon CAG (polyQ) sont impliquées dans neuf maladies neurodégénératives. Notre groupe a démontré que, lors de la traduction de la protéine ataxine-3 (Atx3) mutée qui est impliquée dans l'ataxie spinocérébelleuse de type 3 (SCA3), un changement du cadre de lecture vers un cadre décalé -1 (GCA) se produit. La traduction dans ce nouveau cadre de lecture entraîne la production de polyalanine et ceci amplifierait la toxicité des polyQ. Le changement de cadre de lecture (ccl) ribosomique peut se produire des virus aux mammifères mais peu de choses sont connues sur son impact chez l'humain. Afin d'étudier ce phénomène dans la protéine Atx3 avec expansion de polyQ, nous avons établi un modèle de *Drosophila* transgénique et testé si c'était l'ARNm ou la protéine mutée qui était toxique. Nous avons aussi employé un essai de toeprinting (TP) afin d'identifier l'emplacement précis où les ribosomes changent de cadre de lecture sur l'ARNm. Nos résultats indiquent que la toxicité est due à la présence de polyalanines faisant suite au ccl et que l'ARNm en soi n'est pas la cause directe de la toxicité. De plus, nous avons observé que les ribosomes s'arrêtent au 48^{ième} codon glutamine et que cet arrêt est spécifique aux polyQ. L'arrêt des ribosomes a d'ailleurs aussi été observé dans d'autres maladies avec expansions de polyQ. Puisque ces maladies ont des caractéristiques communes, un blocage de ce ccl pourrait atténuer les symptômes des patients SCA3 et d'autres maladies à expansions de polyQ.

Mots clés : neurodégénération, changement du cadre de lecture, ataxine-3, *Drosophila*

Résumé en anglais

Coding CAG repeat disorders have been associated with nine neurodegenerative disorders. Our group has previously shown that during the translation of mutant ataxine-3 (Atx3), the protein involved in Spinocerebellar Ataxia type 3 (SCA3), a ribosomal frameshift occurs and leads to the reading of a GCA frame rather than a CAG frame. This new reading frame causes the production of polyalanine in the polyglutamine peptide which increases its toxicity. Ribosomal frameshifts are known to occur in all organisms but little is known about this phenomenon in human. To study ribosomal frameshift along the *ATXN3* transcript, we generated a transgenic *Drosophila* model in which we looked at the toxicity of the mRNA. Also, we developed a toeprinting assay to precisely evaluate where the change of reading frame occurs along the mRNA. Our results suggest that the toxicity observed in our *Drosophila* model results from the production of polyalanine and not from the presence of the mRNA per se. Moreover, the change in reading frame seems to occur at the 48th CAG codon and this pausing of the ribosome also occurs in other polyQ tracts. Because CAG repeat disorders share many characteristics, an alteration of the frameshift could alleviate symptoms of SCA3 patients as well as of many other diseases with coding CAG repeats.

Key word: neurodegeneration, ribosomal frameshifting, ataxin-3, *Drosophila* model

Table des matières

Résumé en français	iv
Résumé en anglais.....	v
Table des matières	vi
Liste des figures	viii
Liste des tableaux.....	ix
Liste des sigles et abréviations.....	x
Remerciements.....	xi
 Chapitre 1-Introduction.....	 1
1.1. Maladies à répétitions CAG.....	1
1.1.1. Maladies à répétitions.....	1
1.1.2. Génétique des maladies à expansions de polyQ.....	1
1.1.3. Instabilité des polyQ	3
1.1.4. Caractéristiques communes liées à la toxicité.....	6
1.1.5. Traitements.....	8
1.2. SCA3	9
1.2.1. Génétique.....	9
1.2.2. Symptômes et pathologie	10
1.3. ATXN3	11
1.3.1. Structure du gène	11
1.3.2. Fonctions de la protéine Atx3.....	12
1.3.3. Expression et localisation.....	13
1.4. Toxicité des alanines produites lors d'un ccl sur le transcrit d'ATXN3	14
1.4.1. Introduction au ccl programmé	14
1.4.2. DMOP.....	16
1.4.3. Études précédentes	18
1.5. But de l'étude	21
 2. Chapitre 2-Toxicité des ARN	 22
2.1. Introduction.....	22
2.1.1. Toxicité de l'ARNm	22
2.1.2. Modèles de <i>Drosophila</i>	25
2.1.3. Modèle de <i>Drosophila</i> pour les maladies à expansion de polyQ.....	27
2.1.4. Description de notre modèle de <i>Drosophila</i>	28
2.2. But de l'étude	29
2.3. Méthodes	30
2.3.1. Création des vecteurs d'expression.....	30
2.3.2. Microscopie	31
2.3.3. Préparation d'épon pour la visualisation des structures internes des yeux de <i>Drosophila</i>	31
2.3.4. Quantification du PCR en temps réel.....	32

2.3.5.	Immunobuvardage	33
2.3.6.	RT-PCR	33
2.4.	Résultats	34
2.5.	Discussion et conclusions	38
3.	Chapitre 3- Essai de toeprinting	40
3.1.	Introduction	40
3.1.1.	Éléments nécessaires au ccl programmé.....	40
3.1.2.	Description de l'essai.....	41
3.1.3.	Seuil pathologique des maladies à expansion de polyQ	44
3.2.	But de l'étude	45
3.3.	Méthodes	45
3.3.1.	Vecteurs d'expression	45
3.3.2.	TP.....	45
3.4.	Résultats.....	47
3.4.1.	ATXN3-CAG	47
3.4.2.	L'arrêt des ribosomes est spécifique aux polyQ.....	47
3.4.3.	Augmentation de la concentration de glutamine.....	48
3.4.4.	Rôle de la séquence glissante.....	49
3.4.5.	Autres séquences contenant des répétitions CAG	50
3.5	Discussion et conclusion	54
4.	Chapitre 4 -Conclusions	57
5.	Références	62

Liste des figures

Figure 1 : Représentation de la protéine Atxn3

Figure 2 : Schéma simplifié du ccl

Figure 3 : Le décalage du cadre de lecture dans le transcrit d'*ATXN3*

Figure 4 : Implication de l'ARNm dans la toxicité observée dans un modèle de *Drosophila* de SCA3

Figure 5 : Quantification de l'ARNm par PCR en temps réel

Figure 6 L'étude des ribosomes avec le TP

Figure 7: Seules les séquences polyQ causent l'arrêt des ribosomes observé dans l'essai de TP

Figure 8 : Effet de la concentration de glutamine et de la séquence glissante sur l'arrêt des ribosomes observé en TP

Figure 9 : Étude d'autres maladies à expansion de polyQ avec le TP

Figure 10 : Modèle de toxicité des expansions de polyQ

Liste des tableaux

Tableau I : Liste des maladies neurologiques causées par une répétition

Tableau II : Les maladies à répétitions polyQ et leurs seuils pathologiques

Liste des sigles et abréviations

ARNi :	Système interférence de l'ARN
ARNm :	ARN messenger
ARNmi :	micro ARN
ARNt :	ARN de transfert
Atx3 :	Protéine ataxine-3
ATXN3:	Gène ataxine-3
ccl :	Changement du cadre de lecture (frameshift)
DMI:	Dystrophie myotonique de type I
DMII:	Dystrophie myotonique de type II
DMOP :	Dystrophie musculaire oculo-pharyngée
DUB :	Déubiquitination
FXTAS :	Syndrome de l'X fragile associé à un tremblement
K :	Lysine
HTT :	Huntingtine
KO :	Knock out
MBL :	Protéine muscle blind like
polyQ :	polyglutamine (Répétition CAG)
SCA3 :	Ataxie Spinocérébelleuse de type 3, aussi appelée maladie de Machado-Joseph
SCA6 :	Ataxie Spinocérébelleuse de type 6
SCA8 :	Ataxie Spinocérébelleuse de type 8
TP :	Essai de toeprinting
UIM :	Domaine d'interaction avec l'ubiquitine

Remerciements

Je voudrais d'abord remercier mon superviseur, Guy Rouleau, pour son appui et sa confiance durant les dernières années. J'ai eu la chance d'évoluer dans un environnement enrichissant dans lequel j'ai beaucoup appris de mes erreurs et où je suis devenue indépendante tout en étant bien encadrée. De plus, j'aimerais remercier tous les membres du laboratoire, ensemble, vous détenez une expertise diversifiée et unique qui a été essentielle à mes travaux. Un merci tout spécial à Patrick sans qui ce laboratoire ne serait pas le même.

Merci à Janet, Michel et Claudia. Tout ceci a commencé avec vous, il y a quelques années déjà.

Pour finir, je remercie mes amis et ma famille. Votre patience, vos encouragements et votre compréhension durant toutes ces années ont été essentiels. Que serait un souper du double dec sans discussion de mouches et de frameshifting ?... Merci à mes parents. Vous m'avez appris, à Nicolas et à moi, que tout est à notre portée, il suffit d'y croire.

Chapitre 1-Introduction

1.1. Maladies à répétitions CAG

1.1.1. Maladies à répétitions

Les répétitions de nucléotides sont fréquentes dans le génome humain et leur longueur est polymorphique. Des répétitions de trois, quatre et même cinq nucléotides se trouvent dans le génome humain et certaines peuvent entraîner des pathologies au niveau du système nerveux central (tableau I). Les maladies à répétitions sont classées selon le type de répétitions ainsi que la localisation de la répétition dans le gène affecté. Les différents types de répétitions ont un mode de toxicité distinct. Ainsi, les répétitions qui sont transmises de manière autosomale dominante semblent causer un gain de fonction alors que les répétitions qui sont transmises de manière autosomale récessive (Syndrome de l’X fragile et Ataxie de Friedrich) causent une perte de fonction (voir revue de La Spada et Taylor [2]).

1.1.2. Génétique des maladies à expansions de polyQ

La maladie de Kennedy a été la première maladie à être directement liée à une expansion pathogénique du codon CAG [3]. Depuis, avec l’avancement rapide des technologies, neuf maladies neurodégénératives ont été liées aux répétitions CAG (polyQ) se trouvant dans une région

codante. Même si ces maladies partagent certaines caractéristiques pathologiques communes, comme par exemple la présence d'agrégat et certains dysfonctionnement cellulaires (voir section 1.1.4 pour plus de détails), les gènes affectés n'ont aucun lien commun outre la présence de polyQ. Par contre, ces maladies semblent toutes être causées par un gain de fonction toxique des différentes protéines contenant les répétitions.

Enfin, l'étude de familles a démontré que, à l'exception de SCA6, toutes ces maladies ont un mode de transmission autosomal dominant. Lorsque la répétition atteint le seuil pathologique sur un des allèles (voir section 3.1.3 pour des détails concernant le seuil pathologique), les symptômes peuvent être observés. Dans certains cas, si l'allèle est de longueur intermédiaire (20-40 CAG), la pénétrance peut être réduite [4-6].

Maladie	Gène	Type répétition	Localisation
Ataxie de Friedreich	<i>FXN</i>	GAA	intron
Ataxie spinocérébelleuse de type 1	<i>ATXN1</i>	CAG	région codante
Ataxie spinocérébelleuse de type 10	<i>ATXN10</i>	ATTCT	intron
Ataxie spinocérébelleuse de type 12	<i>PPP2R2B</i>	CAG	5' UTR
Ataxie spinocérébelleuse de type 17	<i>TATA binding protein</i>	CAG	région codante
Ataxie spinocérébelleuse de type 2	<i>ATXN2</i>	CAG	région codante
Ataxie spinocérébelleuse de type 3	<i>ATXN3</i>	CAG	région codante
Ataxie spinocérébelleuse de type 6(SCA6)	<i>CACNA1A</i>	CAG	région codante
Ataxie spinocérébelleuse de type 7 (SCA7)	<i>Ataxin-7</i>	CAG	région codante
Ataxie spinocérébelleuse de type 8(SCA8)	<i>ATXN8</i>	CTG	5'UTR
Atrophie dentato - rubro - pallido - luisienne	<i>atrophine-1</i>	CAG	région codante
Dystrophie musculaire oculo-pharyngée(OPMD)	<i>PABPN1</i>	GCC	région codante
Dystrophie myotonique de type 1(DMI)	<i>DMPK</i>	CTG	3'UTR
Dystrophie myotonique de type 2(DMII)	<i>ZNF9</i>	CCTG	intron
Épilepsie myoclonique d'Unverricht et Lundborg	<i>GSTB</i>	CCCCGCCCGCG	promoteur
HDL-2	<i>JPH-3</i>	CTG	3' UTR
Maladie de Huntington	<i>HTT</i>	CAG	région codante
Maladie de Kennedy	<i>AR</i>	CAG	région codante
Retard mental lié à l'X	<i>ARX</i>	GCG	région codante
Syndrome de l'X fragile de type 1	<i>FMR1</i>	CGG	5'UTR
Syndrome de l'X fragile type 2	<i>FMR2</i>	GCC	5'UTR
X fragiles associés à un syndrome de tremblement (FXTAS)	<i>FMR1</i>	CGG	5' UTR

Tableau I :Liste des maladies neurologiques causées par une répétition

1.1.3. Instabilité des polyQ

Les polyQ sont parmi les répétitions les plus communes du génome et leurs longueurs peuvent varier [7]. Les variations de la répétition se

produisent lors de la transmission de l'allèle du parent à l'enfant, mais peuvent aussi se produire lors de la différenciation des tissus. Lorsque la séquence atteint le seuil critique de 35 répétitions [8], une variation, expansion ou délétion, se produit dans plus de 80% des cas lors de la transmission parentale [9]. Contrairement aux répétitions se trouvant dans les régions non-codantes qui peuvent varier de 100 à 1 000 répétitions par génération, les variations de longueur sont généralement beaucoup plus modestes pour les polyQ dans les régions codantes [8].

L'instabilité lors de la transmission est dépendante du parent qui transmet l'allèle et une augmentation de l'instabilité a été observée lorsque l'allèle provient du père. De plus, cette instabilité cause fréquemment une augmentation du nombre de répétitions qui mène, plus souvent que pour la mère, à la maladie [10] [11].

Dans des études portant sur la maladie de Huntington, la variation de la longueur des répétitions entre différents tissus semble spécifique aux régions affectées. Ainsi, une grande variation de la répétition est observée au niveau des neurones présents dans le striatum [12]. Par contre, l'instabilité n'explique pas toute la spécificité de la pathologie puisque le cervelet, une région affectée dans plusieurs maladies à expansion de polyQ, semble, être propice au rétrécissement de la répétition [13] [14] [15]. De plus, dans un

modèle de souris Huntington, la variabilité semble débiter avec le vieillissement de l'animal pour ces neurones [16].

Certains facteurs semblent influencer la stabilité des répétitions. Ainsi, dans SCA3, un polymorphisme se trouvant en 3' de la répétition affecte la stabilité de la répétition[17] [18]. De plus, ce polymorphisme est associé à la répétition puisqu'il n'a pas été observé chez des individus présentant moins de 20 CAG[19].

Le mécanisme causant cette variabilité n'est pas encore complètement connu. À ce jour, deux mécanismes semblent importants : la réplication et la réparation de l'ADN [9]. La variabilité dans les gamètes (causant la variabilité entre les générations) est surtout causée par le glissement de l'ARN polymérase lors de la réplication de l'ADN. Si les polyQ forment une structure secondaire sur le brin sœur, il y aura expansion; mais si la structure secondaire se forme sur le brin mère, il y aura contraction de la répétition. Pour ce qui est du système de réparation de l'ADN, il est lié aux variations entre les tissus. Lorsqu'il y a réparation de l'ADN via le système d'excision de base, une structure secondaire formée par une séquence polyQ peut cacher le signal d'arrêt du mécanisme et causer la production d'une répétition beaucoup plus grande (pour une revue sur les mécanismes d'instabilité voir McMurray et al. [8]). Il est à noter que ces mécanismes se produisent dans

plusieurs organismes et ont permis d'augmenter la diversité du génome, essentielle à l'évolution. Seulement certaines de ces variations de la séquence de l'ADN sont pathologiques.

De plus, pour toutes ces maladies, le phénomène d'anticipation est directement lié à l'instabilité des répétitions. Même si d'autres facteurs peuvent l'influencer, l'âge de début des symptômes est souvent inversement lié à la longueur des répétitions [20]. Donc, plus la répétition est longue, plus les symptômes débutent tôt et la répétition a tendance à augmenter avec les générations, faisant en sorte que l'âge de début diminue au fil des générations.

1.1.4. Caractéristiques communes liées à la toxicité

Les maladies à expansion de polyQ sont des maladies progressives qui affectent le système nerveux. Ainsi, bien que les allèles sauvage et muté soient exprimés dans plusieurs tissus, l'allèle mutant ne semble toxique que pour certains neurones et aucun lien direct, à l'exception de SCA6, n'a été démontré entre les sites pathologiques et l'expression des protéines affectées [17]. Le cervelet et le tronc cérébral sont particulièrement affectés dans ces maladies. Bien que les symptômes soient similaires, ils varient entre les maladies et entre les individus atteints de la même maladie. Entre les

individus atteints, la variabilité n'est pas due aux régions affectées, mais souvent à la longueur de la répétition [20].

La formation d'agrégats est une autre caractéristique commune à ces maladies. Les peptides contenant des polyQ semblent avoir une habilité intrinsèque à former des agrégats de type amyloïde. Ainsi, la formation d'agrégats varie en fonction de la longueur de la répétition et de son environnement [21]. Par contre, le rôle de ces agrégats dans la pathogénèse est encore débattu. On a d'abord pensé que les agrégats étaient la source de toxicité des maladies à expansion de polyQ [22, 23], mais récemment, plusieurs évidences semblent indiquer que les agrégats sont protecteurs [24, 25].

Finalement, plusieurs dysfonctionnements cellulaires sont observés dans ces maladies. Ainsi, les fragments de polyQ semblent interagir avec des facteurs de transcription, affectant leur rôle. De plus, le système de dégradation de l'ubiquitine et du protéasome, les mitochondries, l'homéostasie du calcium et le transport axonal, entre autres, sont affectés par ces fragments (pour une revue voir Takahasi et al. [26]).

1.1.5. Traitements

À ce jour, aucun traitement n'a été trouvé pouvant prévenir la perte neuronale ou repousser le début des symptômes des maladies à expansion de polyQ. Seuls les médicaments traitants des symptômes particuliers sont disponibles [27]. Ainsi, le levadopa ou les agonistes de la dopamine peuvent diminuer les symptômes parkinsoniens [28, 29] tout comme l'amantidine agit sur la bradikinsie [30]. Par contre, le traitement des tremblements varie d'un patient à l'autre et ceux-ci doivent généralement en essayer plusieurs avant que le plus efficace soit identifié. Pour le traitement du symptôme le plus commun de ces maladies, l'ataxie, aucun médicament ne semble avoir un effet complet. Les traitements de physiothérapie ou d'ergothérapie sont donc les moyens les plus fiables pour atténuer les symptômes d'ataxie [27].

Finalement, des molécules qui cibleraient les mécanismes cellulaires affectés par les fragments de polyQ pourraient être de bonnes alternatives. Ainsi, des molécules affectant la transcription, les fonctions mitochondriales, l'excitotoxicité, l'apoptose ainsi que la phosphorylation ou le clivage des fragments mutants pourraient être des pistes prometteuses pour le développement de nouveaux traitements.

1.2. SCA3

1.2.1. Génétique

SCA3 est l'ataxie spinocérébelleuse la plus commune au monde. Elle a premièrement été rapportée dans une population portugaise [31], mais a depuis été identifiée dans plusieurs autres pays avec une incidence de plus de 2% parmi la population mondiale [27].

SCA3 est causée par une expansion de polyQ dans la partie codante du gène *ATXN3*, aussi appelé *MJD1*. Ce gène se trouve sur le chromosome 14 et contient 48 Kb qui encodent 11 exons [32]. Les individus normaux ont entre 12 et 40 CAG alors que les individus atteints ont plus de 55 codons CAG. La majorité des individus atteints sont hétérozygotes pour l'allèle muté, mais certains cas d'homozygosité ont été rapportés causant un âge de début précoce [33-35].

La région comprenant entre 40 et 55 CAG est appelée région intermédiaire. Certains individus normaux ont été détectés avec jusqu'à 51 CAG [4] alors que certaines personnes atteintes avaient seulement 45 CAG [36]. Cela suggère donc que d'autres facteurs peuvent influencer le développement de la maladie.

La pénétrance est considérée complète puisque peu de cas ont été rapportés sans pénétrance [37]. Par contre, une pénétrance moins grande des répétitions se trouvant dans la région intermédiaire pourrait expliquer le chevauchement entre certaines répétitions pathologiques et certaines non pathologiques avec un nombre de CAG similaire [37].

1.2.2. Symptômes et pathologie

L'âge de début de la maladie varie grandement entre les individus atteints. Ainsi, les symptômes débutent en moyenne autour de 40 ans, mais ont déjà été rapportés chez des individus ayant entre 4 et 70 ans [33, 37]. De plus, les symptômes progressent lentement allant jusqu'à la mort près de 20 ans après le début des symptômes [37].

Une grande hétérogénéité des symptômes de SCA3 rend la classification des cas très difficile. Par contre, pour la majorité des individus atteints, une corrélation existe entre les symptômes et la longueur de la répétition [38]. De plus, les symptômes de vision double ainsi que le manque de coordination dans la démarche sont souvent les premiers symptômes à se manifester [37]. Ainsi, trois sous-types de la maladie ont été répertoriés correspondant aux trois premières familles portugaises atteintes de SCA3 (Joseph, Tomas et Machado). L'âge de début ainsi que les symptômes varient entre ces sous-types, mais tous les groupes présentent une ataxie cérébelleuse [37]. De

plus, la dystonie, la rigidité, la perte proprioceptive, le dysfonctionnement du système nerveux autonome ainsi que, dans certains cas, la présence de problèmes cognitifs sont parmi les symptômes les plus communs [39].

Ces symptômes sont causés par une perte neuronale sélective dans le cervelet, le thalamus, la substance noire, le striatum, les nerfs crâniens, le bulbe rachidien, la moëlle épinière ainsi que le tronc cérébral [17, 39]. Comme pour les autres maladies à expansion de polyQ, la présence d'inclusions a été détectée. Ainsi, dans les noyaux et les axones de ces neurones, il y a présence d'inclusions ubiquitinées qui colocalisent avec certains éléments du protéasome et de l'autophagie [40, 41] .

1.3. *ATXN3*

1.3.1. Structure du gène

Grâce à l'épissage alternatif, le gène *ATXN3* peut se présenter sous plus de 50 ARNm matures. Près de la moitié de ces ARNm sont dégradés via le système dégradation des ARNm non-sens, ceux restant produisent 20 protéines isoformes dont la plus grande fait 42 kDa [42]. La protéine produite, lorsque complète, contient un domaine josphine, deux ou trois domaines d'interaction avec l'ubiquitine (UIM) et la séquence de polyQ (figure 1). Le domaine josphine se trouvant en 5', est similaire à ceux

trouvés dans les protéines ayant une fonction de déubiquitination (protéine DUB) et contient une lysine ubiquitinable (K117). Les UIM sont de part et d'autre de la séquence de polyQ et contiennent cinq sites de phosphorylation possibles. Finalement, deux séquences d'exports nucléaires se trouvent dans le domaine Joséphine et un signal de localisation nucléaire se trouve entre le deuxième UIM et la séquence CAG (pour une revue voir Matos et al. [39]).

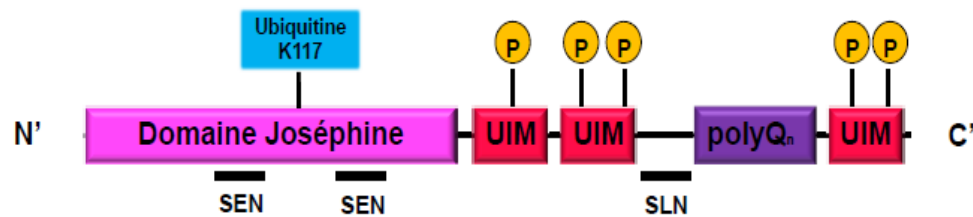


Figure 1: Représentation de la protéine Atxn3. Atxn3 contient un domaine Joséphine, trois domaines d'interaction avec l'ubiquitine (UIM) et une séquence polyQ. Le domaine Joséphine contient une lysine ubiquitinable et deux séquences exports nucléaires (SEN). Les cinq sites de phosphorylation (P) se trouvent dans les UIM et la séquence de localisation nucléaire se trouve en 5' de la séquence polyQ

1.3.2. Fonctions de la protéine Atx3

La fonction exacte de l'Atx3 n'est toujours pas connue. Par contre, toutes les protéines contenant un domaine Joséphine ont des fonctions de déubiquitination et en se liant à certaines protéines, les DUB empêchent la dégradation des protéines. Ainsi, il a été observé dans des souris KO pour l'ATXN3 une augmentation du nombre de protéines ubiquitinées [43]. Par contre, la spécificité d'Atx3 n'a pas pu être déterminée.

Un autre modèle KO, celui de *C.elegans*, a permis d'identifier une nouvelle fonction pour l'Atx3. Ainsi, les vers mutants avaient des dérégulations au niveau de la transcription [44]. De plus, les protéines CREB, CPB, PCAF et p300 [45], des activateurs de la transcription, peuvent se lier avec Atx3, ce qui semble indiquer un rôle pour Atx3 dans le processus de transcription.

Enfin, par ses interactions avec les protéines tubuline, dynéine, MAP2 [46] et certaines intégrines [47], ainsi que par l'augmentation de la mort cellulaire observée lorsque l'expression de la protéine est diminuée (knock-down) [48], Atx3 semble aussi jouer un rôle dans le maintien du cytosquelette et dans la myogénèse.

1.3.3. Expression et localisation

La protéine Atx3 est exprimée dans presque toutes les cellules. Dans le cerveau, on la retrouve principalement dans les neurones, mais aussi dans les cellules gliales. De plus, le niveau d'expression ne varie pas entre les individus atteints et les individus normaux [49] [50]. Ainsi, la spécificité de l'expression d'Atx3 ainsi que son niveau d'expression ne sont pas impliqués dans la pathogenèse de SCA3.

La protéine Atx3 sauvage se trouve principalement dans le cytoplasme, mais a aussi été identifiée dans le noyau, les mitochondries et associée à la matrice nucléaire [50-52]. Lorsque la répétition de CAG atteint une longueur pathologique, il y a présence d'inclusions nucléaires augmentant ainsi la quantité d'Atx3 se trouvant dans le noyau.

1.4. Toxicité des alanines produites lors d'un ccl sur le transcrit d'ATXN3

1.4.1. Introduction au ccl programmé

Bien que le changement de cadre de lecture (« *frameshifting* » ou « ccl ») programmé se produit chez tous les organismes [53], celui-ci a été caractérisé plus en détail pour les virus. Les virus l'utilisent pour augmenter l'efficacité de leurs génomes et ainsi encoder plusieurs protéines à partir d'un seul ARN. Ainsi, les virus utilisent souvent le ccl pour ajouter ou éviter un codon stop [53]. Les virus utilisent les ccl +1 et -1, mais dans le contexte de ce mémoire une attention particulière sera portée sur le ccl -1.

Dans un contexte normal, la traduction débute près du codon d'initiation méthionine et les ribosomes décodent l'ARNm codon par codon en restant dans le cadre de lecture initial jusqu'au codon STOP. Certaines mutations, délétions ou insertions, peuvent changer le cadre de lecture. Durant le

processus de ccl programmé, aucune insertion ou délétion de nucléotide n'a lieu, seulement certains éléments encodés par l'ARNm causent le ccl.

Pour que le ccl programmé -1 se produise, trois éléments sont importants : la séquence glissante encodée par l'ARNm, la séquence d'espacement et la structure secondaire complexe. La structure secondaire formée par l'ARNm doit être stable et pouvoir contrecarrer l'action de l'hélicase se trouvant sur le complexe ribosomique durant l'élongation de la traduction, ce qui empêche l'avancement des ribosomes. Lorsque ceux-ci sont arrêtés, la séquence glissante occupe les sites A et P. Dans cette position, une tension est mise sur l'ARNm de sorte que le lien codon-anticodon entre le messenger et les ARNt est brisé ce qui permet aux ribosomes de se déplacer d'un nucléotide du côté 5' du messenger en gardant les mêmes ARNt dans les sites A et P. Pour que ce réalignement soit possible, la séquence d'espacement (entre la structure secondaire et la séquence glissante) doit être entre sept et neuf nucléotides. Suite au réalignement, l'hélicase pourra dérouler la structure secondaire de l'ARNm et les ribosomes poursuivront leur route (revue dans Harger et al. [54]) (figure 2).

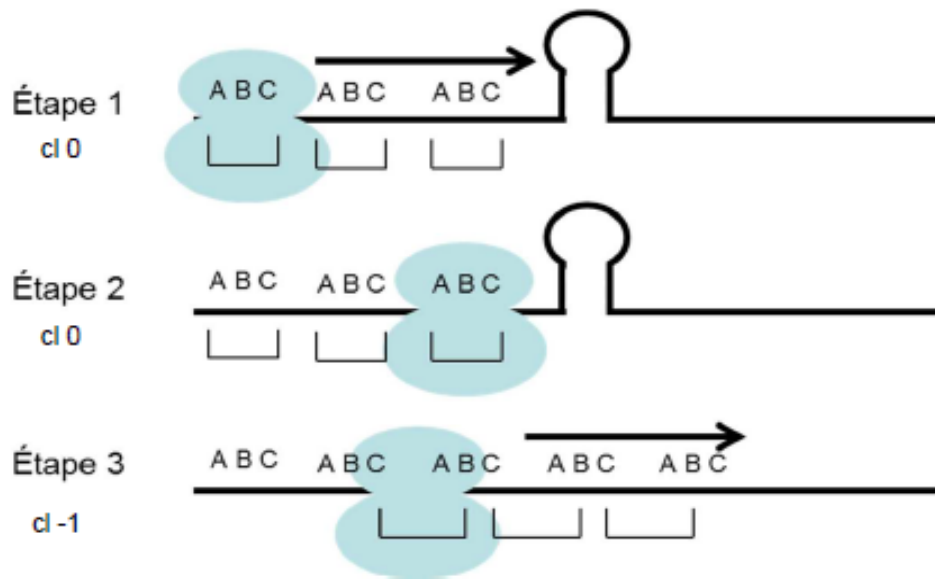


Figure 2: Schéma simplifié du ccl. Les ribosomes décotent l'ARNm trois nucléotides à la fois. Ainsi, avant de rencontrer la structure secondaire, les ribosomes décotent ABC (étape 1). Lorsque les ribosomes rencontrent une structure secondaire qui résiste à l'action de l'hélicase, ceux-ci doivent arrêter (étape 2). Si l'arrêt des ribosomes se fait près d'une séquence glissante, la tension mise sur l'ARNm fera en sorte que les ribosomes se déplaceront d'un nucléotide du côté 5' du messager. Suite à ce réaligement, l'hélicase déroule la structure secondaire et les ribosomes continuent leur procession en lisant dans le cadre de lecture -1, décodant maintenant CAB (étape 3).

1.4.2. DMOP

La dystrophie musculaire oculopharyngée (DMOP) est une maladie causée par une répétition de GCC et GCA dans le gène *PABPN1* [55]. Ce gène est le seul à causer la DMOP et lorsqu'il y a plus de 11 répétitions alanines dans la région codante du premier exon, la maladie est initiée. Le gène *PABPN1* est important pour la polyadénylation de plusieurs ARNm [56].

Contrairement aux maladies à expansion de polyQ codantes, peu de variabilité dans les lignées somatiques ou germinales est observée pour les répétitions GCC et GCA [57]. La présence de polyalanines a été identifiée dans plus de 500 gènes, mais seulement neuf de ceux-ci sont pathogéniques [58]. L'alanine est un acide aminé hydrophobique, non polaire qui forme spontanément des feuillets β très résistants à la dégradation [59].

La DMOP est une maladie dégénérative caractérisée par la présence d'inclusions nucléaires dans les muscles squelettiques [60]. Le rôle exact de ces inclusions dans la pathologie n'est pas encore complètement connu, mais semble, tout comme pour les maladies à expansion de polyQ codantes, avoir un but protecteur [61]. De plus, les inclusions peuvent emprisonner d'autres types de molécules affectant ainsi les fonctions normales de la cellule. En plus des inclusions, d'autres caractéristiques sont similaires entre les maladies à expansion de polyQ et la DMOP. Ainsi, l'âge de début, la présence d'une dégénérescence spécifique à certains tissus malgré l'expression de la protéine dans presque toutes les cellules [56], la présence de molécules d'ubiquitination dans les agrégats et finalement l'implication de molécules chaperonnes [50], laissent penser à un mécanisme de toxicité semblable dans la DMOP et les maladies à expansions de polyQ.

1.4.3. Études précédentes

Les caractéristiques communes entre la DMOP et SCA3 nous ont menés à l'hypothèse d'un ccl le long des polyQ de l'ATXN3. Si un ccl -1 se produit durant la lecture des codons CAG, c'est alors un codon GCA qui est lu par les ribosomes ce qui mène à la production de polyalanine (figure 3A).

Dans une première étude [62], notre groupe a développé un anticorps contre un peptide qui est spécifique à la séquence peptidique produite si un ccl a lieu. Cet anticorps a été utilisé dans la détection de lymphoblastes humains et de tissus de patients. Cet anticorps a été essentiel pour démontrer la présence de ccl chez les patients.

Suivant cette étude, nous avons développé différents vecteurs d'expression à transfecter dans des lignées cellulaires. Ainsi, Toulouse et al [63], ont démontré que la production de la protéine dans le cadre de lecture -1 était causée par un ccl au niveau des ribosomes et était influencée par différentes molécules qui affectent le ccl programmé. De plus, le ccl est spécifique aux répétitions CAG et causerait la toxicité observée dans SCA3 puisque les répétitions CAA, qui encodent aussi des polyglutamines, ne démontrent aucune toxicité. Donc, il a été suggéré que la toxicité des répétitions CAG en général, ne proviendrait pas de la production d'un long peptide

glutaminique, mais plutôt de la présence d'alanines à l'intérieur de ce peptide.

Entre temps, d'autres groupes ont aussi étudié le ccl dans les maladies à expansion de polyQ. Premièrement, des études concernant la maladie de Huntington ont été faites et les ccl -1 et +1 semblent se produire le long de l'ARNm [64]. De plus, de possibles séquences glissantes ont été identifiées dans les transcrits d'*ATXN3* (figure 3B) et *HTT* (gène de la Huntingtine impliqué dans la maladie de Huntington) [1] et il a été démontré que l'ARNm d'*ATXN3* contient une longue répétition pouvant former une structure secondaire complexe [65]. Donc tous les éléments seraient présents dans l'*ATXN3* pour l'occurrence d'un ccl programmé.

Ces études démontrent donc que la présence d'alanines cause la toxicité des répétitions CAG et que cela surviendrait suite à un ccl programmé similaire à celui observé chez les virus.

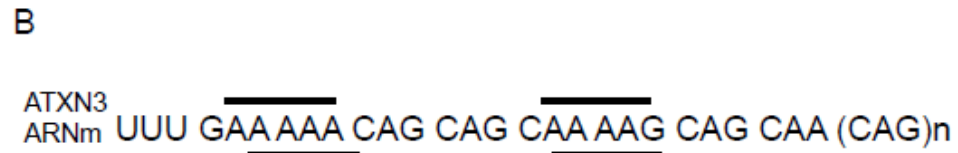
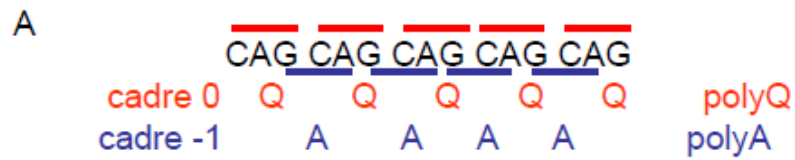


Figure 3: Le ccl dans le transcrit d'*ATXN3*. Les répétitions du codon CAG encodent des peptides glutaminiques dans le cadre de lecture principal et des peptides polyalanines dans le cadre de lecture -1 (A). Les séquences A AAG et A AAA se trouvant en 5' de la séquence polyQ ont été identifiées comme étant de possible séquences glissantes [1]. Ces séquences permettraient le ccl durant la traduction d'*ATXN3* (B)

1.5. But de l'étude

Cette étude a pour but de caractériser le ccl observé précédemment dans l'ATXN3. Ainsi, dans ce mémoire se trouve l'étude de différents aspects du ccl, chaque chapitre traitant d'un aspect en particulier. Premièrement, suite au développement d'un modèle de *Drosophile*, nous avons étudié de nouvelles hypothèses entourant la toxicité des répétitions CAG. De plus, nous avons utilisé certaines des techniques qui ont fréquemment été utilisées dans l'étude du ccl programmé chez les virus pour caractériser le ccl observé dans nos modèles pour SCA3.

Pour cela nous avons :

- évalué la toxicité de l'ARNm dans un modèle de *Drosophile* (Chapitre 2)
- développé un essai de *toeprinting*(TP) pour étudier l'arrêt des ribosomes le long de l'ARNm (Chapitre 3)

2. Chapitre 2-Toxicité des ARN

2.1. Introduction

2.1.1. Toxicité de l'ARNm

Parmi toutes les maladies causées par une répétition de nucléotides, certaines sont causées par la présence de la répétition dans la région non codante d'un gène (tableau II). Tout comme pour les maladies à expansion de polyQ, la toxicité est due à un gain de fonction. Puisque la présence de répétitions dans les régions non codantes ne cause pas la production de protéines aberrantes, d'autres modes de toxicité ont été suggérés. Ainsi, pour la DMI, la DMII, le FXTAS et la SCA8, il a été démontré que la toxicité des répétitions proviendrait de l'ARNm.

Les maladies les plus connues étant causées par une toxicité de l'ARN sont les deux types de dystrophie myotonique. Deux gènes ont été identifiés pouvant causer la DMI et la DMII, *DMPK* pour la DMI [66] et *ZNF9* pour la DMII [67]. Dans ces gènes, des répétitions de trois et quatre nucléotides ont été liées au développement de la DMI et la DMII, respectivement. Même si les gènes affectés ainsi que la nature des répétitions sont différents, la DMI et la DMII sont des maladies très semblables qui partagent plusieurs

caractéristiques pathologiques communes. Il a donc été suggéré qu'un mécanisme de toxicité similaire causerait ces maladies.

En effet, il a été démontré que dans les deux cas, les ARN forment des structures secondaires semblables et causent la toxicité. La formation de foci d'ARN est une caractéristique de ces maladies et ces foci jouent un rôle important dans le développement des symptômes. Dans ces amas d'ARN, on retrouve l'ARNm pathologique en plus de certaines protéines qui se lient aux répétitions pathologiques et qui sont essentielles au développement de la pathologie telles que la protéine 'muscleblind like' (MBL) [68]. Ainsi, il a été démontré que la présence de MBL dans ces foci affecte les fonctions normales de la cellule, en agissant sur la maturation de l'ARN et d'autres protéines [69]. De plus, les ARN qui dépendent de ces protéines sont directement liés aux symptômes observés [70].

Bien que l'hypothèse des foci d'ARN soit connue depuis longtemps, il a récemment été démontré que l'ARN double brin formé par les répétitions peut aussi activer le système d'interférence de l'ARN (ARNi) dans la cellule. Par ce système, les cellules utilisent des microARN pouvant rendre silencieux d'autres ARNm. Ainsi, les brins d'ARNm pathologiques peuvent être vus comme étant des microARN et être incorporés dans le système d'ARNi [71]. L'ARN pathologique sera donc coupé et inhibera la traduction d'autres ARN

ou causera leur dégradation tout comme un microARN (pour revue concernant ce mécanisme voir O'Rourke et al. [72]).

Aussi, un mécanisme similaire de toxicité a été suggéré pour certaines répétitions CAG. Ainsi pour SCA8, il a été suggéré que la toxicité proviendrait, en partie, de l'ARN. Toutefois, il est important de préciser que cette ataxie est différente des autres maladies à expansion de polyQ puisqu'il a été démontré que le gène produit deux transcrits opposés. Ainsi, deux types de répétitions sont présents, CAG et CTG, CTG se trouvant dans la région du 3' UTR alors que les polyQ se trouvent dans une région codante. Il est suggéré que les différents ARN produits ainsi que la protéine (ne contenant que la polyQ) pourraient jouer un rôle dans la toxicité [73]. Pour la maladie de Huntington, il a été démontré que l'ARNm pathologique pouvait former des foci et être impliqué dans la toxicité [74].

Pour ce qui est de SCA3, la protéine MBL a été identifiée comme un modificateur du phénotype observé dans un modèle de *Drosophila* [75]. Il a donc été suggéré qu'un mécanisme de toxicité similaire à celui observé dans la DMI et la DMII pourrait être impliqué dans la SCA3. Dans le même article, il a été suggéré que la différence de toxicité observée entre les répétitions CAG et CAA pourrait être expliquée par l'hypothèse de l'ARN toxique. La protéine MBL interagirait spécifiquement avec la structure secondaire formée par

l'ARN contenant les polyQ et participerait ainsi à la toxicité observée dans SCA3. Il est connu que la structure de l'ARNm contenant des répétitions CAA est différente de celle contenant des polyQ, seuls les ARN contenant des polyQ pouvant former une structure en épingle à cheveux [63]. Par contre, dans des modèles différents, la toxicité causée par les répétitions dans l'ataxine-1 [76] et l'Atx3 [77] semble provenir seulement de la protéine produite et non de l'ARN. Ainsi, le rôle de l'ARNm dans la pathogenèse de SCA3 est encore débattu.

2.1.2. Modèles de *Drosophile*

Les modèles animaux sont indispensables à la recherche scientifique. L'utilisation de souris, de mouches ou de vers a permis d'accroître nos connaissances concernant plusieurs maladies. Le choix du modèle animal est souvent basé sur les coûts, le temps et les tests à effectuer. Ainsi, la *Drosophila melanogaster*, aussi appelée mouche à fruits, est un modèle qui nécessite peu de matériel, est donc peu dispendieux, et a une croissance très rapide. De plus, puisque son génome est simple (quatre chromosomes seulement), qu'il contient peu de gènes redondants et que les manipulations génétiques sont faciles à faire, la mouche à fruits est utilisée pour l'étude de diverses maladies [78].

La *Drosophila* contient 165 millions de bases, distribuées sur quatre paires de chromosomes encodant près de 13 millions de gènes. Plus de 50% de ces gènes partagent une homologie avec un gène humain et plusieurs mécanismes, tels la signalisation cellulaire, la mort cellulaire et l'expression génique, semblent conservés entre l'humain et la *Drosophila* [78]. De plus, ce modèle est adapté à l'étude des maladies du système nerveux puisque la mouche à fruits a un cerveau, contrairement aux vers, et celui-ci contient plus de 300 000 neurones organisés en régions avec une fonction spécifique, tout comme c'est le cas pour l'humain [79].

La création de mouches transgéniques exprimant différents gènes peut se faire très rapidement. L'œil de la mouche est ainsi souvent utilisé pour l'expression de certains gènes puisqu'il est très résistant aux modifications et que l'apparition de phénotypes est facile à détecter. Ainsi, le système d'expression GAL4 est souvent utilisé pour exprimer un gène dans certains tissus. Selon ce système développé par Brand et Perrimon en 1993, deux lignées de mouches sont nécessaires; une contenant le gène d'intérêt sans l'activateur, mais contenant les sites de liaison GAL4 et une deuxième lignée contenant seulement l'activateur GAL4 [80]. Ainsi, les parents n'expriment pas le gène, ils sont donc viables même si le gène est toxique, et seulement le croisement entre une femelle contenant l'élément GAL4 et un mâle contenant le gène à tester l'exprimera. La localisation de l'expression peut

varier en changeant le promoteur utilisé et le niveau d'expression dépend de la température ambiante [80]. Ainsi, en utilisant le promoteur *gmr*, le gène d'intérêt sera exprimé dans toutes les cellules de l'œil durant le développement de la *Drosophila*.

2.1.3. Modèle de *Drosophila* pour les maladies à expansion de polyQ

Plusieurs modèles animaux ont été faits pour étudier la toxicité des expansions de polyQ. Ainsi, des souris [81], des mouches [82] ou plus récemment des vers [83], ont été utilisés pour exprimer différentes longueurs de polyQ seules ou dans le contexte de différents gènes. Bien que le modèle de souris soit celui dans lequel les animaux développent un phénotype qui ressemble le plus aux symptômes humains, aucun modèle ne représente complètement les changements neuropathologiques observés, ainsi que la spécificité des régions affectées [84].

Ainsi, le modèle de *Drosophila* a souvent été utilisé pour étudier certains aspects des maladies à expansion de polyQ. En comparant les différents modèles, on a pu constater qu'une séquence de CAG seule est plus toxique que lorsque la répétition est dans le contexte d'un gène [85]. De plus, dans le cas d'*ATXN3*, les domaines du gène, tel le domaine josphine, diminuent la toxicité causée par la polyQ [86] rendant l'expression d'*ATXN3* tronquée plus

toxique que l'expression du gène de l'*ATXN3* pleine longueur [87].
 Finalement, le rôle de la signalisation cellulaire, des molécules chaperonnes, du système ubiquitine, de la transcription, du transport axonal et de la mort cellulaire des maladies à expansion de polyQ a aussi été étudié grâce à différents modèles de *Drosophila* (pour une revue voir Bilen et Bonini [82]).

2.1.4. Description de notre modèle de *Drosophila*

Dans le but d'étudier SCA3 et les polyQ, nous avons récemment généré un modèle de *Drosophila* dans notre laboratoire (Gaspar, Stochmanski et al. en préparation). Ce modèle utilise le système gmr-Gal4 pour exprimer, dans l'œil de la mouche, la protéine d'intérêt.

Voici un résumé des caractéristiques de notre modèle :

- Les mouches ont été injectées avec les vecteurs d'expression contenant l'ADN complémentaire d'*ATXN3* suivi de différents épitopes après la polyQ. Les différents vecteurs expriment soit *ATXN3*-(CAG)₁₄ (non-pathogénique), *ATXN3*-(CAG)₈₉ (pathogénique) ou *ATXN3*-(CAA)₉₁ (non pathogénique). Plusieurs lignées ont été créées exprimant le même vecteur d'expression. De plus, l'expression de la protéine a été confirmée par immunobuvardage pour toutes les lignées.

- Les mouches exprimant *ATXN3*-(CAG)₈₉ ont rapidement démontré un phénotype externe de la rétine. Ce phénotype s'avère être progressif donc représentant bien SCA3. De plus, une dégénération interne a été observée en faisant des sections d'épon et se caractérise par un amincissement de la rétine.
- Les mouches exprimant *ATXN3*-(CAG)₁₄ et *ATXN3*-(CAA)₉₁ étaient semblables aux mouches contrôles (gmr-GAL4 x w118) et n'ont jamais démontré de phénotype externe. De plus, aucun dommage interne n'a été observé et la rétine semble avoir une épaisseur intacte.
- Avec l'aide des différents épitopes, nous avons observé la présence de protéines dans la cadre de lecture -1 spécifiquement dans les mouches exprimant *ATXN3*-(CAG)₈₉, ce qui est conforme à nos autres modèles développés précédemment [63].
- Suite à ces observations, nous pouvons conclure que notre modèle de *Drosophila* représente bien SCA3 et est utile dans la caractérisation du ccl observé pour l'*ATXN3*.

2.2. But de l'étude

Dans ce chapitre, avec l'aide des nouvelles lignées de *Drosophila*, nous avons étudié si la différence entre les répétitions CAG et CAA est due à

l'implication de l'ARNm ou bien à la production d'alanines suite à un ccl dans les lignées CAG.

2.3. Méthodes

2.3.1. Création des vecteurs d'expression

Les vecteurs d'expression de *Drosophila* décrits dans la figure 4A contiennent l'ADN complémentaire d'*ATXN3* suivi de la répétition CAG₈₉ (pathologique) (*ATXN3-CAG₈₉*). Pour l'étude spécifique de l'ARNm, nous avons généré des lignées dans lesquelles nous avons inséré un codon stop devant la répétition CAG ou CAA (*ATXN3-STOP-CAG₉₄* ou *ATXN3-STOP-CAA₉₄*) dans un vecteur pUAST. Suivant la répétition, des épitopes ont été placés pour pouvoir observer les changements du cadre de lecture possibles (Myc dans cadre 0; HA dans le cadre-1 et His dans le cadre +1).

Pour la génération des lignées, les œufs de *Drosophila* de type w118 ont été injectés avec les vecteurs par la compagnie «Genetic Services, Inc». Les mouches exprimant les transgènes ont été gardées dans un environnement à 50% d'humidité et à température de 25 °C et nourries avec de la nourriture typique (mélange mélasse, agar et semoule de maïs). Pour les croisements, des mouches femelles vierges gmr-GAL4 ont été croisées avec des mâles pour obtenir des lignées transgéniques exprimant dans l'œil, les génotypes

suivant $\text{expCAG}_{92}/\text{gmr-GAL4}$, $\text{expCAG}_{92}\text{STOP}/\text{gmr-GAL4}$ et $\text{expCAA}_{96}\text{STOP}/\text{gmr-GAL4}$. Un croisement contrôle a été utilisé dans chaque expérience. Pour cela, des femelles gmr-GAL4 ont été croisées avec des mâles w118 (lignée sans transgène).

2.3.2. Microscopie

Les têtes de mouches ont été placées dans du Tissue-Tek (Sakura Finetek) sur glace puis coupées au cryostat de Leica à 10 μm d'épaisseur. Les tissus ont été fixés avec du paraformaldéhyde 4% (15 min) puis perméabilisés avec du Triton-X et bloqués avec du sérum de chèvre normalisé 10%. Les tissus ont ensuite été incubés toute la nuit avec les anticorps primaires [anti-myc (Sigma-Aldrich) 1 :100; anti-HA (Roche) 1 :100 ou anti-His (abcam) 1 :100] puis avec les anticorps secondaires [anticorps fluorescents Alexa 1 :500 (Invitrogen)] pendant 60 min. Les résultats ont ensuite été visualisés avec un microscope à fluorescence Leica (CTR6000) ou avec un microscope confocal (Leica SP5).

2.3.3. Préparation d'épon pour la visualisation des structures internes des yeux de *Drosophila*

Les têtes de mouches ont été fixées dans du glutéraldéhyde à 2% puis déshydratées avec de l'éthanol. Ensuite, elles ont été placées dans une

solution de 2% d'osmium tétraoxide (tampon au phosphate) pour 60 min et finalement dans le l'oxyde propylène pour 30 min. Les têtes ont été placées dans un mélange d'oxyde de propylène et d'épon (1 :1) toute la nuit puis placées dans l'épon 100% 24h à 60°C, les blocs ont été coupés au microtome (1µm d'épaisseur) et colorés avec du bleu de toluidine. Les photos ont été prises avec un microscope Leica (CTR 6000).

2.3.4. Quantification du PCR en temps réel

Vingt têtes de mouches ont été coupées et l'ARN extrait avec du trizol. Après l'homogénéisation, du chloroforme a été ajouté et les tubes centrifugés 15 min à 12 000 rpm. La partie aqueuse a été gardée et une précipitation à l'isopropanol a été faite. Les culots ont ensuite été lavés dans l'éthanol 75% et resuspendus dans l'eau sans RNase. Ensuite l'ADN complémentaire a été produit en utilisant l'enzyme Superscript Vilo (Invitrogen) en suivant les instructions du manufacturier et 1µg d'ARN. La PCR en temps réel a été faite selon la méthode Taqman (Applied Biosystems) avec deux sondes qui reconnaissent *ATXN3* (HS01026447_n1 and HS00245259_n1) et une sonde contre l'ARNm encodant la protéine ribosomale L32 de la *Drosophile* (Dn02151827_g1). La fluorescence a été capturée sur un système de détection ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems). Le niveau d'expression a été déterminé en calculant la donnée Ct en utilisant la méthode $2^{-\Delta \Delta C_t}$ [88]. L'expression d'*ATXN3* a été normalisée avec celle de *RPL32* de la

Drosophile et calculé en comparaison à la moyenne des lignées CAG₉₂. Les expériences ont été faites trois fois avec deux extractions différentes.

2.3.5. Immunobuvardage

Vingt têtes ont été lysées dans du tampon RIPA contenant de l'inhibiteur de protéases (Boehringer) puis soniquées deux fois 10 sec et centrifugées pendant 5 min à 10 000 rpm. Les surnageants ont ensuite été quantifiés et 30ug de chaque échantillon a été bouilli 10 min dans du tampon Laemmli, séparé sur gel SDS-PAGE et transféré sur membrane de nitrocellulose (Bio-rad). Pour la détection, les anticorps primaires anti-ataxine-3 (Millipore) et anti-actine (Chemicon) ont été utilisés (1 :1 000 pour chaque) puis l'anticorps secondaire anti-souris IgG (HRP 1 :10 000) (Cell Signaling).

2.3.6. RT-PCR

L'ARNm été extraite selon la méthode décrite dans la section 2.3.4. Pour la réaction de transcription inverse, les amorces pdn6 ont été utilisées avec 3 mg d'ARN (65°C, 5 min) puis 60 min à 37°C. 5 ul de la réaction ont été amplifiés (1 cycle à 94°C, 1 min; 35 cycles 94°C/1 min, 58°C/45 sec (*ATXN3*) ou 55°C (*GAPDH*), 1 cycle 72°C/1 min, et 1 cycle 72°C/5 min). Les produits ont été visualisés sur gel d'agarose.

2.4. Résultats

Pour tester la toxicité de l'ARNm, nous avons généré différentes lignées exprimant l'*ATXN3*, mais contenant un codon STOP devant la répétition de glutamines (figure 4A). Donc, pour les constructions STOP, l'ARNm sera identique à celui produit dans les constructions sans codon stop, mais la protéine ne contiendra pas de glutamines.

Lorsque nous comparons les constructions STOP avec les constructions dont la polyQ est traduite, nous observons que l'ajout du codon stop élimine complètement le phénotype externe de dégénération (figure 4B b vs c et d). Donc, les mouches exprimant *ATXN3*-STOP(CAG)₉₄ et *ATXN3*-STOP(CAA)₉₄ ne démontrent aucune perte de pigmentation externe de l'œil ainsi qu'aucune perte d'organisation des photorécepteurs (figure 4B g et h). Avec une immunohistochimie, nous observons aussi que la rétine de ces mouches est d'épaisseur semblable à celle des mouches contrôles (figure 4B; i vs k et l flèches).

Pour être certain que la différence de phénotype n'est pas causée par une différence au niveau de l'ARNm ou de la protéine, des immunobuvardages, de RT-PCR ainsi que des PCR en temps réel ont été fait. Pour ce qui est de la

protéine, la détection a été faite avec des anticorps anti-Atxn3 et anti-actine (control de chargement) et les tailles des bandes correspondent aux tailles prévues selon les vecteurs d'expression (figure 4C). Pour quantifier le niveau d'expression, la densité des bandes de chaque anticorps a été mesurée et le ratio Atxn3/actine a été calculé. Le niveau d'expression d'Atxn3 semble plus bas dans les lignées STOP(CAG)₉₄. Pour ce qui est de l'ARNm, des RT-PCR (figure 4D) ont été faits et ils démontrent la présence de l'ARNm ainsi que la présence de la répétition puisque les bandes ont la taille prévue selon les vecteurs d'expression. Pour quantifier l'ARNm, des PCR en temps réel (méthode Taqman) ont été faits (figure 5) et ils démontrent que toutes les lignées expriment ceux-ci à des niveaux supérieurs ou égaux lorsque comparés au niveau moyen des lignée CAG₉₂.

Donc, dans notre modèle, la production d'une protéine contenant la répétition CAG traduite est nécessaire pour l'observation de la toxicité et l'expression de l'ARNm seulement ne cause aucune dégénération.

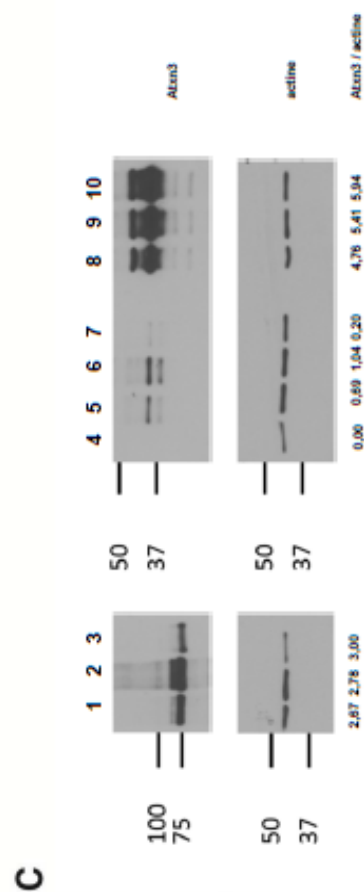
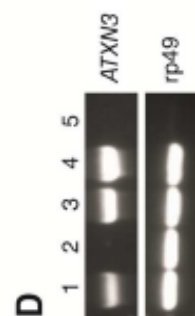
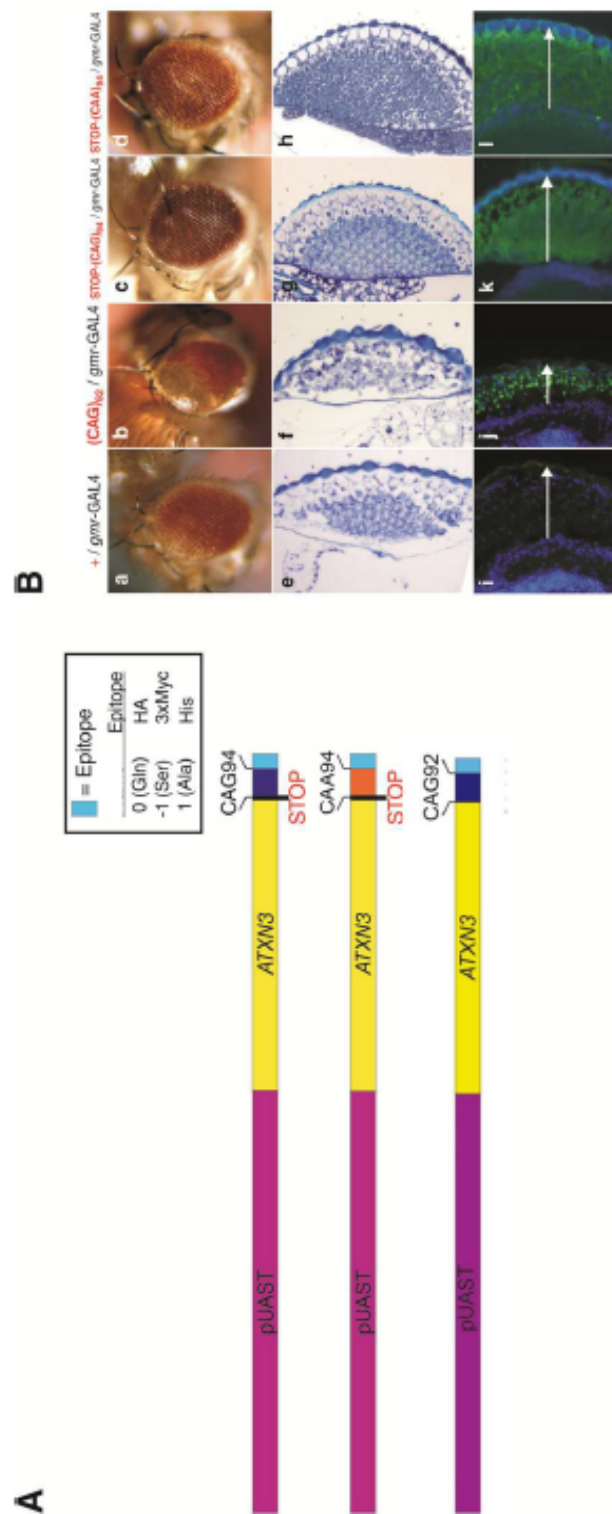


Figure 4: Étude de la toxicité de l'ARN dans un modèle de *Drosophile*. Les vecteurs d'expression utilisés sont décrit en (A). Un phénotype externe et interne au niveau des yeux de *Drosophile* est observé seulement lorsqu'Atxn3 contenant une séquence polyQ est exprimée. De plus, l'épaisseur de la rétine (indiquée par les flèches) diminue lorsqu'Atxn3-(CAG)₉₂ est exprimée. Lors de l'ajout d'un codon STOP devant une répétition CAG ou CAA, il y a diminution de la toxicité indiquant que la présence de l'ARNm, comme telle, n'est pas toxique. a-d représentent l'œil externe des mouches; e-h représentent l'œil interne suite à une préparation à l'épon et une coloration au bleu de toluidine; i-l représentent des immunohistochimies des noyaux (bleu) et Atxn3(vert) (B). L'expression de l'Atxn3 a été confirmée dans toutes les lignées transgéniques par immunobuvardages détectés avec les anticorps anti-ataxine-3 et anti-actin. Les puits 1-3 (CAG)₉₂/gmr-GAL4; puit 4 control négatif (+/gmr-GAL4); puits 5-7 STOP(CAG)₉₄/gmr-GAL4; les puits 8-10 STOP(CAA)₉₄/gmr-GAL4. Le ratio Atxn3/actin a été calculé (C) La présence de l'ARN a été confirmée par RT-PCR. Puit 1: _{exp}CAG₉₂/gmr-GAL4; puit 2: +/gmr-GAL4 control négatif; puit 3: STOP-CAG₉₄/gmr-GAL4; puit 4: STOP-CAA₉₄/gmr-GAL4; puit 5: eau (D)

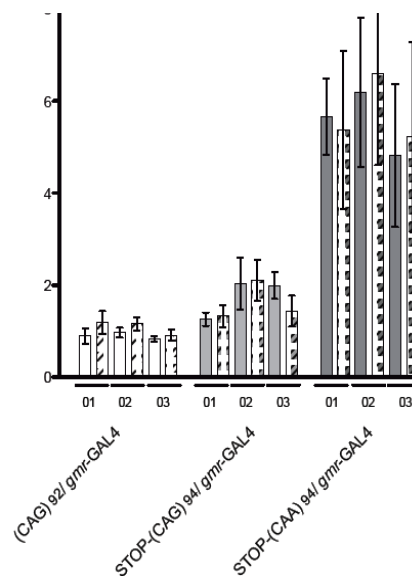


Figure 5: Quantification de l'ARNm par méthode Taqman. Pour toutes les lignées transgéniques, l'ARNm a été quantifié par la méthode Taqman en utilisant deux sondes spécifiques pour l'ATXN3 (la sonde (HS01026447_n1) est représentée par les colonnes unies alors que la sonde (HS00245259_n1) est représentée par les colonnes avec motifs). Les lignées STOP ont un niveau d'ARN plus élevé que les lignées CAG₉₂ donc le niveau d'expression ne peut causer l'absence de phénotype.

2.5. Discussion et conclusions

Suite à la caractérisation de notre modèle de *Drosophila*, nous avons testé certaines hypothèses pouvant mener à la toxicité des expansions de polyQ. Nous avons pu observer qu'en ajoutant un codon stop devant la polyQ, aucune dégénération n'était observée, et ce, même si l'ARN contenait la répétition. Bien que l'expression de la protéine Atxn3 semble être plus basse dans les lignées STOP-CAG₉₄, l'ARN a un niveau plus élevé. Puisque la méthode de densimétrie est une méthode moins précise que la quantification PCR en temps réel et que nous étudions l'effet du l'ARN, cela ne devrait pas influencer nos résultats. Donc, dans notre modèle, l'ARNm ne semble pas toxique.

Ces résultats sont contraires à ce qui a été publié par Li et al [75]. Nous croyons que la différence est due à l'utilisation de vecteurs tronqués comparativement à ceux que nous avons utilisés qui exprimaient le gène *ATXN3* pleine longueur. Il a précédemment été démontré que l'utilisation de vecteurs d'expression tronqués avec l'*ATXN3* augmentaient la toxicité des polyQ dans plusieurs modèles [89] [90] [87] et les vecteurs exprimant des polyQ seules étaient moins toxiques [91].

Récemment, des résultats publiés par Zu et al. suggéraient que les polyQ pouvaient initier la traduction sans l'utilisation du codon d'initiation

méthionine (traduction RAN) [92]. Selon cette hypothèse, c'est grâce à leur structure secondaire que les polyQ pourraient initier la traduction. Dans ce cas, la traduction serait initiée dans différents cadres de lecture (0, +1 et -1) ce qui expliquerait la détection d'alanines, dans nos modèles précédents. Notre modèle de *Drosophila* contenant les codons STOP peut répondre à cette hypothèse. En plus de n'observer aucune toxicité dans les lignées STOP, les épitopes HA, His ou Myc n'ont été détectés dans aucune de ces lignées. Nous pouvons donc dire que la traduction RAN ne se produit pas dans notre modèle.

3. Chapitre 3- Essai de toeprinting

3.1. Introduction

3.1.1. Éléments nécessaires au ccl programmé

Comme nous l'avons expliqué dans un chapitre précédent, pour que le ccl se produise, les ribosomes doivent arrêter leur procession le long de l'ARNm. L'étude de l'arrêt des ribosomes et des facteurs l'influençant est donc essentielle pour la compréhension du phénomène. Ainsi, il a été démontré que, chez les virus, plusieurs éléments influençaient l'arrêt des ribosomes. Ces éléments peuvent être en position trans, tel que les molécules se liant aux ribosomes [93], ou en position cis, tel que la séquence glissante suivie d'une structure secondaire particulière[94].

La séquence glissante est typiquement une séquence de sept nucléotides de type X-XXY-YYZ où, X peut être n'importe laquelle des quatre bases, Y est A ou U et Z est A, U ou C. La nature de la séquence semble pouvoir varier puisque certains virus qui utilisent le ccl programmé ont une séquence plus courte.

Dans le cas d'*ATXN3*, deux séquences glissantes ont été suggérées [1] (figure 3B). Bien qu'elles ne comportent que quatre nucléotides, les deux

permettent le réalignement des ribosomes. De plus, ces séquences se trouvent du côté 5' de la répétition donc précédant la structure secondaire formée par la polyQ. Ainsi, si le ccl observé utilise le même mécanisme que celui utilisé par les virus, ces séquences pourraient avoir un rôle important dans le ccl observé avec l'*ATXN3*.

3.1.2. Description de l'essai

L'essai de toeprinting (TP) a premièrement été décrit par Hartz et ses collègues en 1988 [95] et a depuis été grandement utilisé pour l'étude de différents mécanismes moléculaires ribosomiques tel que l'initiation de la traduction, la pause des ribosomes et la terminaison de la traduction dans un contexte normal ou pathologique. Récemment, l'utilisation de fluorescence dans la procédure à la place de la radioactivité a rendu cet essai encore plus rapide et sécuritaire [96].

Lors de ce test *in vitro*, nous procédons à une traduction standard puis nous l'arrêtons à l'aide de la cycloheximide. Les ribosomes restent donc sur l'ARNm et bloquent la réaction de transcription inverse qui suivra (figure 6A). Puisque l'amorce utilisée est fluorescente, l'ADN complémentaire qui sera produit pourra être analysé sur le séquenceur d'ADN. En analysant la taille des ADN complémentaires produits, nous pouvons connaître l'endroit exact où les ribosomes se sont arrêtés. Il est important de noter que l'amorce se

situe en 3' de la répétition donc à la fin du transcrit. Ainsi, lorsque nous analysons les résultats, plus les bandes sont petites, plus elles sont près de l'amorce et donc se trouve à la fin de la répétition. Pour aider à la compréhension, une image inversée du transcrit a été mise sous les résultats pour bien situer les bandes observées en comparaison à la polyQ (figure 6B). Comme contrôle, nous utilisons une réaction dans laquelle il n'y a pas de ribosome; mais seulement l'ARNm et l'amorce. En comparant les réactions avec et sans les ribosomes, nous pouvons identifier les bandes spécifiques aux ribosomes. Si les ribosomes s'arrêtent à un endroit spécifique, plusieurs ADN seront produits avec cette taille et ne se trouveront pas dans la réaction contrôle.

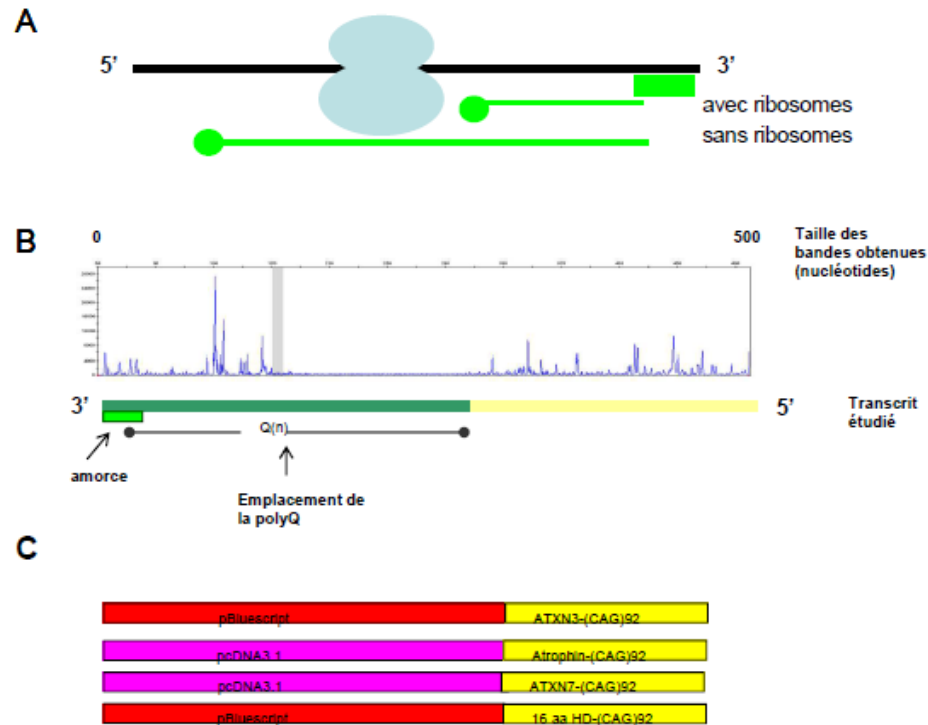


Figure 6: L'étude des ribosomes avec le TP. Lors du TP, nous pouvons situer l'emplacement des ribosomes sur l'ARNm puisque la présence des ribosomes arrête l'élongation de l'amorce placée en 3' lors de la réaction de transcription inverse. Une réaction de transcription inverse sur un ARNm sans ribosome est toujours utilisée comme control négatif, théoriquement, cette réaction devrait continuer jusqu'à la fin du transcrit (A). Lors de l'analyse des résultats, il est important de noter que plus les bandes sont petites (à la gauche du graphique des résultats), plus elles sont près de l'amorce. Pour aider à la compréhension des résultats, un diagramme représentant le transcrit inversé avec l'amorce et la position de la séquence polyQ a été placé sous chaque figure. Un exemple d'analyse des résultats se trouve en (B). Les vecteurs exprimant ATXN3, atrophine, ATXN7 et HTT avec des séquences polyQ pathologiques ont été utilisés dans cette étude (C)

3.1.3 Seuil pathologique des maladies à expansion de polyQ

Les maladies à expansion de polyQ partagent plusieurs caractéristiques communes. Bien que les différents gènes affectés n'aient aucune caractéristique commune (expression, localisation, rôle) ces maladies

maladie	protéine	CAG normal	CAG pathologique
SBMA	récepteur androgen	6-35	38-62
DRPLA	atrophin	3-38	49-88
Maladie de Huntington	huntingtin	6-35	36-121
SCA2	ataxine 2	14-32	34-77
SCA3	ataxine 3	10-51	55-87
SCA6	CACNA1A	4--20	20- 29
SCA7	ataxine 7	4-35	38-200
SCA17	TBP	25-42	47-63

Tableau II- Maladie à répétitions CAG codants et leur seuil pathologiques respectifs.

partagent plusieurs manifestations pathologiques. Il est suggéré que ces similarités soient dues à la présence de polyQ de longueur similaire. Il est vrai que bien qu'ayant des seuils pathologiques différents, ceux-ci sont similaires et pourraient être un déterminant important de ces maladies. Pour toutes ces maladies, les répétitions pathologiques sont, à l'exception de SCA6, situées entre 36-49 CAG [39] (tableau II). Ce fait intéressant semble démontrer qu'un mécanisme de toxicité commun lie toutes ces maladies.

3.2. But de l'étude

Dans ce chapitre, nous voulons étudier une étape importante du ccl : l'arrêt des ribosomes. Nous voulons identifier l'endroit où les ribosomes s'arrêtent pour ainsi savoir où se produit le ccl. De plus, nous voulons démontrer que l'arrêt des ribosomes se produit spécifiquement lorsque la séquence de polyQ est encodée par le codon CAG et étudier le rôle des éléments en position cis tels que les séquences glissantes d'*ATXN3* sur l'arrêt des ribosomes. Finalement, nous validerons si les résultats obtenus avec *ATXN3* peuvent s'appliquer à d'autres maladies à expansion de polyQ.

3.3. Méthodes

3.3.1. Vecteurs d'expression

Les gènes d'*ATXN3* et de *HTT* ont été placés dans un vecteur pBluescript. Le vecteur contenant l'atrophine nous a été gracieusement donné par Shoji Tsuji et l'*ATXN7* provient de Lisa Ellerby. L'*ATXN7* et l'atrophine sont dans un vecteur pcDNA3.1 (figure 6C)

3.3.2. TP

L'ARNm a été fait selon les instructions du kit mMessenger (Ambion); avec un promoteur T3 pour le vecteur Bluescript et un promoteur T7 pour le vecteur pcDNA3.1. Pour le TP, 1 µg d'ARNm a été hybridé avec 1 µg

d'amorces appropriées, placé dans un bloc chauffant à 70°C pendant 10 min. Ensuite, le bloc a été enlevé du réchaud et refroidi jusqu'à ce que la température atteigne 37°C (environ 30 min). Ensuite, nous avons procédé à la traduction *in vitro* dans des lysats de réticulocytes de lapin. 15 µl de mélange de traduction (selon les directives du kit "Retic lysate kit" Ambion) est ajouté pendant 20 min à 22°C. Pour chaque échantillon, une réaction ne contenant pas le mélange de traduction a été utilisée comme contrôle. Ce mélange contient l'ARNm et les amorces directement dans le tampon transcription inverse (voir plus bas).

Pour arrêter la traduction, on ajoute 15 µl de tampon de transcription inverse (50 µM tris HCl, 40 µM KCl, 6mM MgCl₂, 5mM DTT, 575 µM dNTP) et 1 U de RNAase out par µl de tampon de transcription inverse et cyclohexamide (100ng/µl). Pour la réaction de transcription inverse, on ajoute 2 µl de Superscript II (Invitrogen) et on la laisse 20 min à 22°C. Le ADNc a ensuite été séparé avec du phénol : chloroforme : isoamyl suivi d'une précipitation à l'éthanol. Les ADN complémentaires obtenus ont ensuite été lus par le séquenceur DNA sequencer (3730 DNA analyzer, Applied Biosystem).

3.4. Résultats

3.4.1. *ATXN3*-CAG

En utilisant une construction exprimant le gène *ATXN3* complet dans un vecteur pBluescript, nous avons observé un arrêt des ribosomes caractérisé par une série de bandes qui ne se trouvent pas dans la réaction sans ribosome (figure 7A). Avec la taille de ces bandes, nous avons pu identifier l'arrêt des ribosomes à la répétition 48. Bien que l'intensité des bandes varie d'un essai à l'autre, les bandes sont toujours observées au même endroit.

Plusieurs autres bandes peuvent être observées. Par contre, elles ont aussi été observées dans les réactions contrôles donc ne sont pas spécifiques aux ribosomes. Ces bandes sont probablement dues à l'arrêt de l'enzyme de transcription inverse. Nous savons que cette enzyme est sensible aux structures secondaires donc peut facilement s'arrêter lorsqu'elle en rencontre une.

3.4.2. L'arrêt des ribosomes est spécifique aux polyQ

Nous avons aussi fait cette expérience avec une construction identique, mais dont la polyQ a été remplacé par une répétition de CAA. Nous pouvons observer qu'aucune bande ne semble spécifique à l'arrêt des

ribosomes lorsque nous comparons les réactions avec et sans ribosomes (figure 7B). De plus, aucune bande ne semble être spécifique à la répétition 48 (flèche figure 7b). La grande différence entre les bandes produites par la polyQ comparativement à l'expansion CAA est probablement due à la grande différence entre les structures secondaires de leur ARNm respectif. Ces résultats sont donc conformes à plusieurs articles suggérant une différence majeure entre ces deux transcrits [63] [75]. De plus, si les ribosomes ne s'arrêtent à aucun endroit spécifiquement dans la séquence CAA, cela suggère qu'il n'y a pas de ccl. Ces résultats sont donc conformes à ce que nous avons observé dans des modèles précédents suggérant que le ccl est spécifique aux polyQ [63].

3.4.3. Augmentation de la concentration de glutamine

Une possibilité qui expliquerait l'arrêt des ribosomes pourrait être le manque de tRNA-glutamine dans la réaction. Pour répondre à cette question, nous avons donc ajouté du L-glutamine (30 uM et 50 uM) dans la réaction. Selon le protocole de la trousse de transcription (Retic lysate kit (Ambion)), les enzymes présentes dans le lysat de réticulocytes devraient pouvoir charger la glutamine sur l'ARNt approprié.

Lorsque nous avons ajouté la glutamine dans les réactions, nous n'avons observé aucune différence significative. Les bandes de la répétition 48 ont

été observées dans toutes les réactions, peu importe la quantité de glutamine ajoutée (figure 8A, flèche indiquant la répétition 48). L'arrêt des ribosomes semble donc indépendant de la quantité de glutamine dans la réaction.

3.4.4. Rôle de la séquence glissante

L'hypothèse initiale de cette expérience était d'observer l'arrêt des ribosomes près de la séquence glissante comme cela a été fait lors de l'étude de d'autres séquences pouvant causer le ccl [94]. Aucune bande spécifique n'a été observée à l'endroit exact ou autour des séquences glissantes (flèches vertes figure 7A). Bien que l'arrêt des ribosomes semble se produire loin de la séquence glissante, sachant que celle-ci semble être importante dans le ccl programmé, nous avons tenté de savoir si cette séquence influence nos résultats de TP. Pour ce faire, nous avons généré un vecteur d'expression dans lequel les deux séquences glissantes possibles ont été mutées pour des séquences ne pouvant permettre le ccl programmé (figure 8B).

La mutation de ces séquences ne semble pas influencer l'arrêt des ribosomes. Aucune variation de bande n'a été observée à la répétition 48. Le phénomène qui cause l'arrêt des ribosomes près de la répétition 48 ne

semble donc pas être lié à la présence de ces séquences, suggérant ainsi un mécanisme de ccl différent du ccl programmé observé chez les virus.

3.4.5. Autres séquences contenant des répétitions CAG

Plusieurs caractéristiques sont partagées par les polyQ, ainsi nous avons voulu voir si l'arrêt des ribosomes pouvait être observé dans d'autres transcrits contenant une polyQ. Nous avons donc étudié l'arrêt des ribosomes dans les transcrits de *HTT*, d'*ATXN7* et d'atrophine.

Le transcrit généré par *ATXN7* contenant une répétition pathologique (102 CAG) semble aussi promouvoir l'arrêt des ribosomes. Une série de bandes ressemblant à une courbe en forme de cloche similaire à celle observée avec *ATXN3* a été observée avec *ATXN7* et semble démontrer l'arrêt des ribosomes près de la répétition 56, ces bandes n'ont jamais été observées dans la réaction contrôle (figure 9A). Ainsi, un mécanisme similaire causant l'arrêt des ribosomes semble se produire lors de la traduction d'*ATXN3* et d'*ATXN7*.

Ensuite, nous avons utilisé le transcrit généré par le gène *HTT* contenant aussi une polyQ pathologique. L'ARNm produit par *HTT* semble aussi arrêter la procession des ribosomes durant la traduction. Ainsi, bien qu'aucune bande ne soit ajoutée dans la réaction avec ribosomes, certaines bandes

disparaissent à cause des ribosomes (figure 9B, flèche verte). Nous croyons que ces bandes, qui sont présentes dans la réaction sans ribosome, disparaissent dans la réaction avec ribosomes puisque les ribosomes sont situés autour des bandes représentant la répétition 63 (figure 9B-flèche rouge) et l'action de leur hélicase déroule l'ARN. Donc, dans la réaction sans ribosome, les bandes sont causées par la structure secondaire de l'ARN, mais dans la réaction avec ribosomes, la structure secondaire est défaite probablement par la présence de ribosomes dans cette région. Finalement, ces bandes sont aussi autour du seuil pathologique de la maladie de la maladie de Huntington.

Finalement, nous avons testé la séquence d'atrophine, impliquée dans la DRPLA, et contenant aussi une longue polyQ. Dans cette séquence, les ribosomes ne semblent pas s'arrêter à un endroit spécifique. Ainsi, les réactions avec et sans ribosomes démontrent des bandes similaires (figure 9C) et ce, même avec des conditions de réactions de traduction et de transcription inverse variées (résultats non inclus).

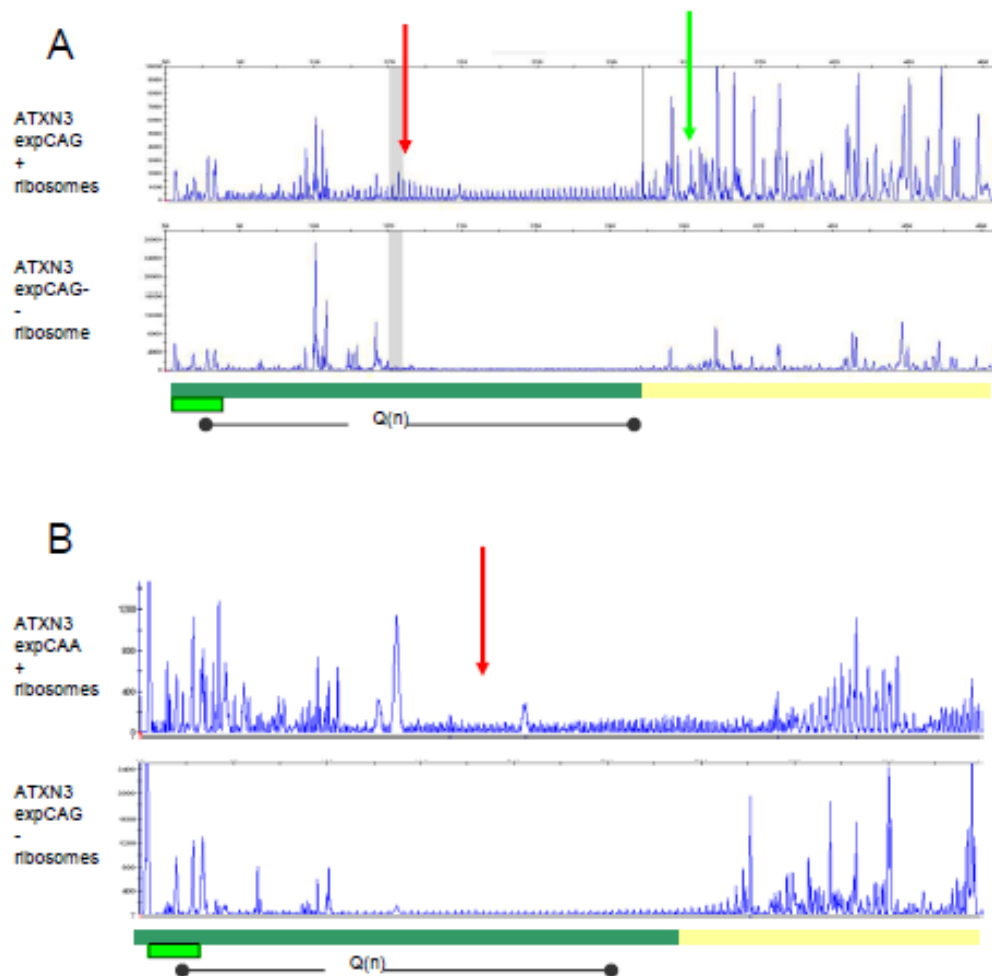


Figure 7-Seules les séquences polyQ causent l'arrêt des ribosomes observé dans l'essai de TP. Résultats avec et sans ribosomes pour ATXN3-CAG_{exp}. Lors de la traduction d'ATXN3, les ribosomes ne semblent pas s'arrêter dans la région des séquences glissantes (flèche verte), mais près de la répétition 48 (flèche rouge) (A) Lorsque la séquence polyQ est mutée pour une répétition CAA, aucun arrêt n'est observé près de la répétition 48 (flèche rouge) (B) Le diagramme sous les résultats représente la structure du transcrit étudié avec l'emplacement de la séquence polyQ ainsi que de l'amorce.

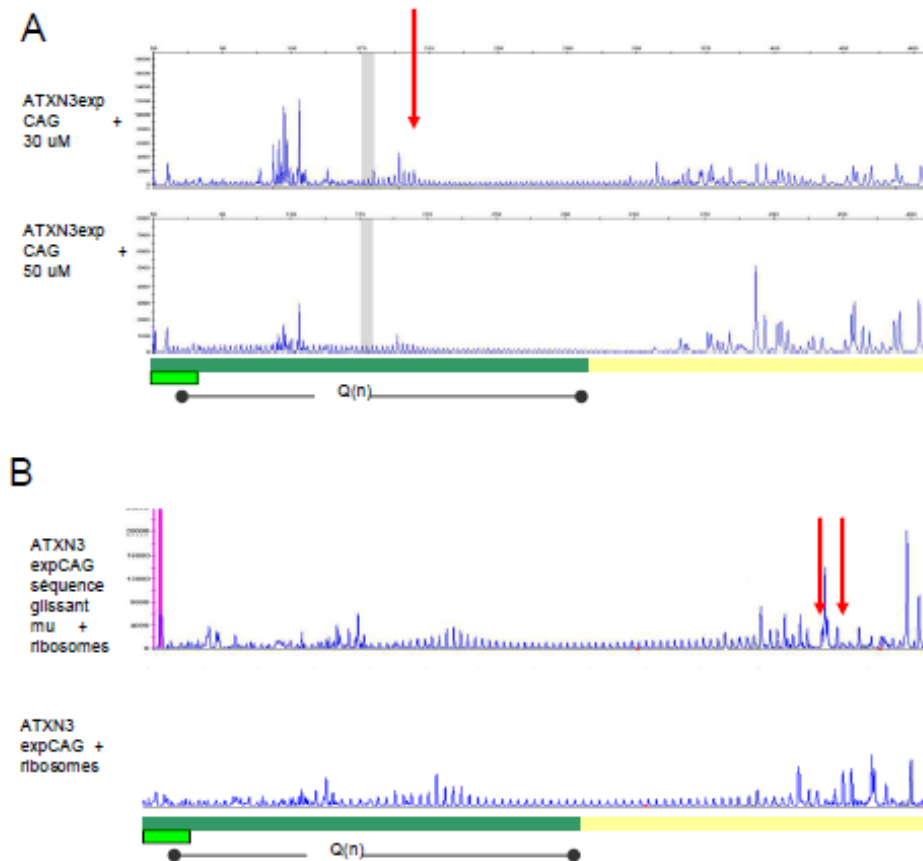


Figure 8- Effet de la concentration de glutamine et de la séquence glissante sur l'arrêt des ribosomes observé en TP. Une modification de la concentration de glutamine dans la réaction ne semble pas modifier l'arrêt des ribosomes puisque les bandes de la répétition 48 (flèche rouge) sont présentes dans toutes les réactions. La réaction contenant 50uM de glutamine représente les conditions utilisées dans toutes les expériences (A). La mutation des séquences glissantes ne causent pas de variation des résultats observés dans ATXN3 tant au niveau de la répétition 48 qu'à l'emplacement des séquences glissantes indiquées par les flèches rouges (B) Le diagramme sous les résultats représente la structure du transcrit étudié avec l'emplacement de la séquence polyQ ainsi que de l'amorce.

L'arrêt des ribosomes est un mécanisme important lors du ccl. Ainsi, les ribosomes doivent s'arrêter assez longtemps pour changer de cadre de lecture. Ce temps de pause est assez long pour être observé grâce au TP et en étudiant l'emplacement de la pause, nous pouvons connaître l'endroit où le ccl se produit. Dans l'étude du ccl le long des polyQ, en sachant où se produit le ccl, nous pouvons aussi évaluer le nombre d'alanines produites.

Nos résultats démontrent que les ribosomes semblent s'arrêter à la répétition 48 lors de la traduction du transcrit d'*ATXN3* contenant une longueur pathologique de polyQ. De plus, la pause des ribosomes est spécifique aux répétitions CAG et n'est pas causée par un manque de glutamine. Dans notre modèle, contrairement à ce que l'on prévoyait, la séquence glissante ne semble pas agir sur l'arrêt des ribosomes. Par contre, la mutation de la séquence glissante pourrait entraîner une variation de la quantité de ccl. Seule une méthode de quantification du ccl pourrait définitivement expliquer le rôle des séquences glissantes sur le ccl. Si le ccl ne se produit pas avec l'aide de la séquence glissante, d'autres modèles pourraient être envisagés pour expliquer le ccl observé. La concentration de glutamine, aussi, ne semble pas affecter l'arrêt des ribosomes, mais seul un essai quantitatif pourrait écarter l'hypothèse du ccl causé par la déplétion du codon glutamine. La déplétion de codon rare a déjà été la cause du ccl -1 [97]. De plus, des phénomènes durant lesquels les ribosomes sautent par-

dessus une séquence d'ARNm pour recommencer la traduction en 3' [98] ou durant lequel le mauvais ARNt est incorporé [99] pourraient aussi être des causes possibles de la présence de peptides contenant des polyalanine dans Atxn3.

Finalement, la pause des ribosomes a aussi été observée dans d'autres séquences contenant des polyQ, mais pas dans toutes les séquences étudiées (atrophine). Ainsi, un facteur intrinsèque au transcrit semble influencer l'arrêt des ribosomes. Dans les cas d'ATXN3, d'ATXN7, et de Huntintine, si l'arrêt des ribosomes conduit au ccl dans la région près du seuil pathologique, il y aurait production de plus de 40 alanines dans ces protéines contenant 90 répétitions CAG, augmentant ainsi significativement la toxicité des polyQ. Chez les patients, la longueur des répétitions est généralement plus petite, mais un ccl se produisant près du seuil pathologique augmenterait tout de même la toxicité. En effet, dans les maladies causées par des polyalanines, une courte séquence de la répétition est suffisante pour causer la toxicité.

4. Chapitre 4 -Conclusions

Les expansions de polyQ sont impliquées dans, au moins, neuf maladies neurodégénératives. Elles deviennent pathologiques lorsque la répétition atteint un seuil spécifique pour chaque maladie. Bien que les gènes impliqués dans ces maladies ont rapidement été identifiés, le mode de toxicité des expansions de polyQ est encore inconnu et aucun traitement n'existe pour ces maladies.

Les expansions de polyalanines sont aussi impliquées dans des maladies telles que la DMOP. La DMOP est causée par la présence des expansions GCA ou GCC dans le gène *PABPN1*. Plusieurs similarités existent entre les maladies à expansion de polyQ et la DMOP, telles que l'âge de début, la présence d'inclusions ubiquitinées et la spécificité de la dégénérescence malgré l'expression des gènes dans la majorité des cellules humaines.

En utilisant le gène *ATXN3*, impliqué dans la SCA3, nous avons précédemment démontré que la toxicité des expansions de polyQ *in vitro*, serait similaire à la toxicité observée dans la DMOP. Lors de la traduction des expansions de polyQ, un changement de cadre de lecture se produit causant la production du codon GCA et produisant des polyalanines.

Ainsi, ce mémoire est une continuation des résultats publiés précédemment par notre groupe [62, 63]. Premièrement, pour étudier le phénomène du ccl *in vivo*, nous avons développé un modèle de *Drosophila*. De plus, grâce à ce modèle, nous avons étudié la toxicité des ARNm dans la toxicité des polyQ. Deuxièmement, nous avons élaboré un essai de TP pour étudier les phénomènes ribosomiques.

Ainsi, nous pouvons conclure que :

- 1) l'ARNm ne semble pas impliqué dans la toxicité des polyQ dans notre modèle de *Drosophila*
- 2) les ribosomes s'arrêtent spécifiquement lors de la traduction des polyQ dans le transcrit d'*ATXN3* près du seuil pathologique.

Ces résultats sont ainsi en accord avec ceux publiés précédemment par notre groupe démontrant que la production de peptides glutaminiques ne cause pas de toxicité. En effet, la toxicité proviendrait de la production d'alanines suite à un ccl (figure 10). Notre hypothèse explique ainsi la différence de toxicité observée dans notre modèle et dans plusieurs autres entre les répétitions CAG et CAA bien que les deux produisent un peptide glutaminique. De plus, grâce à l'essai de TP, nous pouvons prédire que le ccl se produit lorsque les ribosomes s'arrêtent près de la répétition 48. Ainsi, il y

aurait production du peptide contenant des polyQ suivi de plusieurs alanines jusqu'à la fin de la répétition.

Le ccl des ribosomes est un phénomène méconnu chez l'humain. Ainsi, en caractérisant celui se produisant lors de la traduction d'*ATXN3*, nous augmentons grandement les connaissances concernant ces phénomènes ribosomiques. De plus, la caractérisation du phénomène permet de mieux cerner la toxicité observée dans les maladies à expansion de polyQ. Ainsi, la spécificité de la dégénération pourrait être expliquée par une augmentation du ccl des ribosomes causant la production d'alanines dans certains tissus. Cette augmentation du changement de cadre pourrait être due à des facteurs de traduction qui influenceraient l'avancement des ribosomes spécifiquement dans certain tissus.

De la même manière qu'il était important de démontrer la présence du ccl dans un modèle *in vivo*, il serait essentiel de démontrer que les résultats obtenus dans la deuxième partie de ce mémoire (Chapitre 3) représentent bien les phénomènes ribosomiques se produisant *in vivo*. Ainsi, un essai similaire à celui du TP, le 'heelprinting', peut être utilisé pour étudier l'arrêt des ribosomes isolés à partir d'extrait cellulaire. Cet essai serait donc une suite logique et confirmerait la validité du TP.

Enfin, aucun traitement n'existe pour la SCA3 ainsi que pour toutes les maladies à expansion de polyQ. Le changement de cadre de lecture pourrait être une cible thérapeutique potentielle qui diminuerait la toxicité des polyQ. Des molécules qui affectent la structure secondaire de l'ARNm ou diminueraient le temps d'arrêt des ribosomes pourraient potentiellement diminuer le ccl et ainsi causer une diminution de la production d'alanines et potentiellement diminuer la mort neuronale. L'identification de ces molécules serait une perspective intéressante à ce projet. Ainsi, suite à un criblage à grande échelle de molécules, notre modèle de *Drosophila* serait un excellent outil pour tester la validité de ces molécules dans un modèle *in vivo* et observer l'effet de celles-ci sur le ccl et la dégénérescence neuronale.

Puisque les maladies à expansion de polyQ partagent plusieurs caractéristiques communes, le changement de cadre de lecture pourrait se produire dans plusieurs autres séquences de polyQ. Ainsi, ces travaux seraient une perspective meilleure pour les patients atteints de SCA3 et tous ceux atteints de maladies à expansion de polyQ.

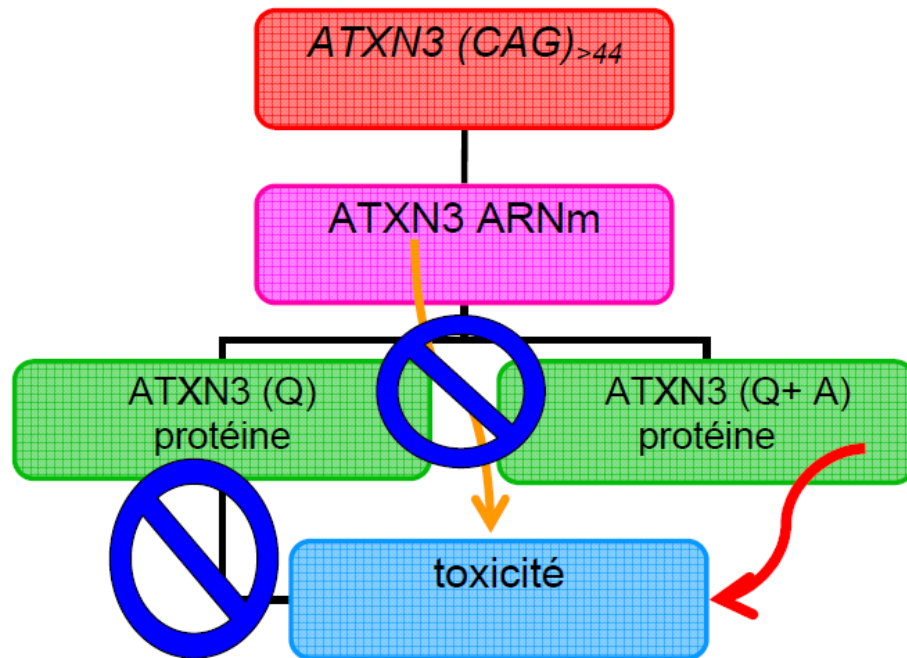


Figure 7: Modèle de toxicité des expansions de polyQ. Lorsque plus de 44 répétitions CAG se trouvent dans la région codante d'ATXN3, la protéine devient toxique. Suite à ce mémoire, nous pouvons conclure que cette toxicité n'est pas due à la présence de peptides glutaminiques (ATXN3 Q) dans la protéine, n'y à la présence de l'ARNm seule. En fait, la toxicité est causée par la présence de polyalanines (A) produites suite à un ccl

5. Références

1. Wills, N.M. and J.F. Atkins, *The potential role of ribosomal frameshifting in generating aberrant proteins implicated in neurodegenerative diseases*. Rna, 2006. **12**(7): p. 1149-53.
2. La Spada, A.R. and J.P. Taylor, *Repeat expansion disease: progress and puzzles in disease pathogenesis*. Nat Rev Genet, 2010. **11**(4): p. 247-58.
3. Spada, A.R.L., et al., *Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy*. Nature, 1991. **352**(6330): p. 77-79.
4. Maciel, P., et al., *Improvement in the molecular diagnosis of Machado-Joseph disease*. Arch Neurol, 2001. **58**(11): p. 1821 - 1827.
5. McNeil, S.M., et al., *Reduced Penetrance of the Huntington's Disease Mutation*. Human Molecular Genetics, 1997. **6**(5): p. 775-779.
6. Oda, M., et al., *Possible Reduced Penetrance of Expansion of 44 to 47 CAG/CAA Repeats in the TATA-Binding Protein Gene in Spinocerebellar Ataxia Type 17*. Arch Neurol, 2004. **61**(2): p. 209-212.
7. Castel, A.L., J.D. Cleary, and C.E. Pearson, *Repeat instability as the basis for human diseases and as a potential target for therapy*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(3): p. 165-170.
8. McMurray, C.T., *Mechanisms of trinucleotide repeat instability during human development*. Nat Rev Genet, 2010. **11**(11): p. 786-799.
9. Kovtun, I.V. and C.T. McMurray, *Features of trinucleotide repeat instability in vivo*. Cell Res, 2008. **18**(1): p. 198-213.
10. Kremer, B., et al., *Sex-dependent mechanisms for expansions and contractions of the CAG repeat on affected Huntington disease chromosomes*. Am J Hum Genet, 1995. **57**(2): p. 343-50.
11. Trottier, Y., V. Biancalana, and J.L. Mandel, *Instability of CAG repeats in Huntington's disease: relation to parental transmission and age of onset*. J Med Genet, 1994. **31**(5): p. 377-82.
12. Shelbourne, P.F., et al., *Triplet repeat mutation length gains correlate with cell-type specific vulnerability in Huntington disease brain*. Human Molecular Genetics, 2007. **16**(10): p. 1133-1142.
13. Ito, Y., et al., *Somatic Mosaicism of the Expanded CAG Trinucleotide Repeat in mRNAs for the Responsible Gene of Machado-Joseph Disease (MJD), Dentatorubral-Pallidoluysian Atrophy (DRPLA), and Spinal and Bulbar Muscular Atrophy (SBMA)*. Neurochemical Research, 1998. **23**(1): p. 25-32.

14. Tanaka, F., et al., *Differential pattern in tissue-specific somatic mosaicism of expanded CAG trinucleotide repeat in dentatorubral-pallidoluysian atrophy, Machado-Joseph disease, and X-linked recessive spinal and bulbar muscular atrophy*. Journal of the Neurological Sciences, 1996. **135**(1): p. 43-50.
15. Hashida, H., et al., *Brain regional differences in the expansion of a CAG repeat in the spinocerebellar ataxias: dentatorubral-pallidoluysian atrophy, Machado-Joseph disease, and spinocerebellar ataxia type 1*. Ann Neurol, 1997. **41**(4): p. 505-11.
16. Mangiarini, L., et al., *Instability of highly expanded CAG repeats in mice transgenic for the Huntington's disease mutation*. Nat Genet, 1997. **15**(2): p. 197-200.
17. Riess, O., et al., *SCA3: neurological features, pathogenesis and animal models*. Cerebellum, 2008. **7**(2): p. 125-37.
18. Maciel, P., et al., *Study of three intragenic polymorphisms in the Machado-Joseph disease gene (MJD1) in relation to genetic instability of the (CAG)*n* tract*. Eur J Hum Genet, 1999. **7**(2): p. 147-56.
19. Limprasert, P., et al., *Analysis of CAG Repeat of the Machado-Joseph Gene in Human, Chimpanzee and Monkey Populations: A Variant Nucleotide is Associated with the Number of CAG Repeats*. Human Molecular Genetics, 1996. **5**(2): p. 207-213.
20. Soong, B.W. and H.L. Paulson, *Spinocerebellar ataxias: an update*. Curr Opin Neurol, 2007. **20**(4): p. 438-46.
21. Becher, M.W., et al., *Intranuclear neuronal inclusions in Huntington's disease and dentatorubral and pallidoluysian atrophy: correlation between the density of inclusions and IT15 CAG triplet repeat length*. Neurobiol Dis, 1998. **4**(6): p. 387-97.
22. Davies, S.W., et al., *Formation of Neuronal Intranuclear Inclusions Underlies the Neurological Dysfunction in Mice Transgenic for the HD Mutation*. Cell, 1997. **90**(3): p. 537-548.
23. Martindale, D., et al., *Length of huntingtin and its polyglutamine tract influences localization and frequency of intracellular aggregates*. Nat Genet, 1998. **18**(2): p. 150-154.
24. Arrasate, M., et al., *Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death*. Nature, 2004. **431**(7010): p. 805-810.
25. Takahashi, T., et al., *Soluble polyglutamine oligomers formed prior to inclusion body formation are cytotoxic*. Human Molecular Genetics, 2008. **17**(3): p. 345-356.
26. Takahashi, T., S. Katada, and O. Onodera, *Polyglutamine diseases: where does toxicity come from? what is toxicity? where are we going?* J Mol Cell Biol, 2010. **2**(4): p. 180-91.

27. Schols, L., et al., *Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis*. Lancet Neurol, 2004. **3**(5): p. 291-304.
28. Buhmann, C., A. Bussopulos, and M. Oechsner, *Dopaminergic response in Parkinsonian phenotype of Machado-Joseph disease*. Mov Disord, 2003. **18**(2): p. 219-21.
29. Furtado, S., et al., *SCA-2 presenting as parkinsonism in an Alberta family: clinical, genetic, and PET findings*. Neurology, 2002. **59**(10): p. 1625-7.
30. Woods, B.T. and H.H. Schaumburg, *Nigro-spino-dentatal degeneration with nuclear ophthalmoplegia. A unique and partially treatable clinico-pathological entity*. J Neurol Sci, 1972. **17**(2): p. 149-66.
31. Coutinho, P. and C. Andrade, *Autosomal dominant system degeneration in Portuguese families of the Azores Islands. A new genetic disorder involving cerebellar, pyramidal, extrapyramidal and spinal cord motor functions*. Neurology, 1978. **28**(7): p. 703-9.
32. Kawaguchi, Y., et al., *CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1*. Nat Genet, 1994. **8**(3): p. 221-8.
33. Carvalho, D.R., et al., *Homozygosity Enhances Severity in Spinocerebellar Ataxia Type 3*. Pediatric Neurology, 2008. **38**(4): p. 296-299.
34. Lang, A.E., et al., *Homozygous inheritance of the Machado-Joseph disease gene*. Ann Neurol, 1994. **36**(3): p. 443-7.
35. Sobue, G., et al., *Homozygosity for Machado-Joseph disease gene enhances phenotypic severity*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1996. **60**(3): p. 354-6.
36. Padiath, Q.S., et al., *Identification of a novel 45 repeat unstable allele associated with a disease phenotype at the MJD1/SCA3 locus*. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 2005. **133B**(1): p. 124-6.
37. Bettencourt, C. and M. Lima, *Machado-Joseph Disease: from first descriptions to new perspectives*. Orphanet Journal of Rare Diseases, 2011. **6**(1): p. 35.
38. Maciel, P., et al., *Correlation between CAG repeat length and clinical features in Machado-Joseph disease*. Am J Hum Genet, 1995. **57**(1): p. 54-61.
39. Matos, C.A., S. de Macedo-Ribeiro, and A.L. Carvalho, *Polyglutamine diseases: The special case of ataxin-3 and Machado-Joseph disease*. Prog Neurobiol, 2011.
40. Paulson, H.L., et al., *Intranuclear inclusions of expanded polyglutamine protein in spinocerebellar ataxia type 3*. Neuron, 1997. **19**(2): p. 333-44.
41. Seidel, K., et al., *Axonal inclusions in spinocerebellar ataxia type 3*. Acta Neuropathol, 2010. **120**(4): p. 449-60.

42. Bettencourt, C., et al., *Increased transcript diversity: novel splicing variants of Machado-Joseph disease gene (ATXN3)*. Neurogenetics, 2010. **11**(2): p. 193-202.
43. Schmitt, I., et al., *Inactivation of the mouse Atxn3 (ataxin-3) gene increases protein ubiquitination*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007. **362**(3): p. 734-739.
44. Rodrigues, A.J., et al., *Functional genomics and biochemical characterization of the C. elegans orthologue of the Machado-Joseph disease protein ataxin-3*. FASEB J, 2007. **21**(4): p. 1126-36.
45. Li, F., et al., *Ataxin-3 Is a Histone-binding Protein with Two Independent Transcriptional Corepressor Activities*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(47): p. 45004-45012.
46. Mazzucchelli, S., et al., *Proteomic and biochemical analyses unveil tight interaction of ataxin-3 with tubulin*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2009. **41**(12): p. 2485-2492.
47. do Carmo Costa, M., et al., *Ataxin-3 plays a role in mouse myogenic differentiation through regulation of integrin subunit levels*. PLoS One, 2010. **5**(7): p. e11728.
48. Rodrigues, A.-J., et al., *Absence of ataxin-3 leads to cytoskeletal disorganization and increased cell death*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 2010. **1803**(10): p. 1154-1163.
49. Nishiyama, K., et al., *Regional and cellular expression of the Machado-Joseph disease gene in brains of normal and affected individuals*. Ann Neurol, 1996. **40**(5): p. 776-81.
50. Abu-Baker, A., et al., *Involvement of the ubiquitin-proteasome pathway and molecular chaperones in oculopharyngeal muscular dystrophy*. Hum Mol Genet, 2003. **12**(20): p. 2609-23.
51. Perez, M.K., H.L. Paulson, and R.N. Pittman, *Ataxin-3 With an Altered Conformation That Exposes the Polyglutamine Domain Is Associated With the Nuclear Matrix*. Human Molecular Genetics, 1999. **8**(13): p. 2377-2385.
52. Trottier, Y., et al., *Heterogeneous Intracellular Localization and Expression of Ataxin-3*. Neurobiology of Disease, 1998. **5**(5): p. 335-347.
53. Dinman, J.D., *Programmed Ribosomal Frameshifting Goes Beyond Viruses: Organisms from all three kingdoms use frameshifting to regulate gene expression, perhaps signaling a paradigm shift*. Microbe Wash DC, 2006. **1**(11): p. 521-527.
54. Hager, J.W., A. Meskauskas, and J.D. Dinman, *An integrated model of programmed ribosomal frameshifting*. Trends in Biochemical Sciences, 2002. **27**(9): p. 448-454.
55. Brais, B., et al., *Short GCG expansions in the PABP2 gene cause oculopharyngeal muscular dystrophy*. Nat Genet, 1998. **18**(2): p. 164-7.

56. Albrecht, A. and S. Mundlos, *The other trinucleotide repeat: polyalanine expansion disorders*. Current Opinion in Genetics & Development, 2005. **15**(3): p. 285-293.
57. Pearson, C.E., K.N. Edamura, and J.D. Cleary, *Repeat instability: mechanisms of dynamic mutations*. Nat Rev Genet, 2005. **6**(10): p. 729-742.
58. Amiel, J., et al., *Polyalanine expansions in human*. Human Molecular Genetics, 2004. **13**(suppl 2): p. R235-R243.
59. Forood, B., et al., *Formation of an extremely stable polyalanine beta-sheet macromolecule*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **211**(1): p. 7-13.
60. Brais, B., et al., *Oculopharyngeal muscular dystrophy*. Semin Neurol, 1999. **19**(1): p. 59-66.
61. Messaed, C., et al., *Soluble expanded PABPN1 promotes cell death in oculopharyngeal muscular dystrophy*. Neurobiol Dis, 2007. **26**(3): p. 546-57.
62. Gaspar, C., et al., *CAG tract of MJD-1 may be prone to frameshifts causing polyalanine accumulation*. Hum Mol Genet, 2000. **9**(13): p. 1957-66.
63. Toulouse, A., et al., *Ribosomal frameshifting on MJD-1 transcripts with long CAG tracts*. Hum Mol Genet, 2005. **14**(18): p. 2649-60.
64. Davies, J.E. and D.C. Rubinsztein, *Polyalanine and polyserine frameshift products in Huntington's disease*. J Med Genet, 2006. **43**(11): p. 893-6.
65. Michlewski, G. and W.J. Krzyzosiak, *Molecular architecture of CAG repeats in human disease related transcripts*. J Mol Biol, 2004. **340**(4): p. 665-79.
66. Mahadevan, M., et al., *Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene*. Science, 1992. **255**(5049): p. 1253-5.
67. Ranum, L.P., et al., *Genetic mapping of a second myotonic dystrophy locus*. Nat Genet, 1998. **19**(2): p. 196-8.
68. Miller, J.W., et al., *Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)_n expansions associated with myotonic dystrophy*. EMBO J, 2000. **19**(17): p. 4439-4448.
69. Mankodi, A., et al., *Muscleblind localizes to nuclear foci of aberrant RNA in myotonic dystrophy types 1 and 2*. Human Molecular Genetics, 2001. **10**(19): p. 2165-2170.
70. Ranum, L.P. and J.W. Day, *Pathogenic RNA repeats: an expanding role in genetic disease*. Trends Genet, 2004. **20**(10): p. 506-12.
71. Krol, J., et al., *Ribonuclease Dicer Cleaves Triplet Repeat Hairpins into Shorter Repeats that Silence Specific Targets*. Molecular Cell, 2007. **25**(4): p. 575-586.

72. O'Rourke, J.R. and M.S. Swanson, *Mechanisms of RNA-mediated disease*. J Biol Chem, 2009. **284**(12): p. 7419-23.
73. Moseley, M.L., et al., *Bidirectional expression of CUG and CAG expansion transcripts and intranuclear polyglutamine inclusions in spinocerebellar ataxia type 8*. Nat Genet, 2006. **38**(7): p. 758-769.
74. de Mezer, M., et al., *Mutant CAG repeats of Huntingtin transcript fold into hairpins, form nuclear foci and are targets for RNA interference*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(9): p. 3852-63.
75. Li, L.B., et al., *RNA toxicity is a component of ataxin-3 degeneration in Drosophila*. Nature, 2008. **453**(7198): p. 1107-11.
76. Klement, I.A., et al., *Ataxin-1 nuclear localization and aggregation: role in polyglutamine-induced disease in SCA1 transgenic mice*. Cell, 1998. **95**(1): p. 41-53.
77. McLeod, C.J., L.V. O'Keefe, and R.I. Richards, *The pathogenic agent in Drosophila models of 'polyglutamine' diseases*. Hum Mol Genet, 2005. **14**(8): p. 1041-8.
78. Mallik, M. and S.C. Lakhotia, *Modifiers and mechanisms of multi-system polyglutamine neurodegenerative disorders: lessons from fly models*. J Genet, 2010. **89**(4): p. 497-526.
79. Hartenstein, V., et al., *The development of the Drosophila larval brain*. Adv Exp Med Biol, 2008. **628**: p. 1-31.
80. Brand, A.H. and N. Perrimon, *Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes*. Development, 1993. **118**(2): p. 401-15.
81. Colomer Gould, V.F., *Mouse models of Machado-Joseph disease and other polyglutamine spinocerebellar ataxias*. NeuroRx, 2005. **2**(3): p. 480-3.
82. Bilen, J. and N.M. Bonini, *DROSOPHILA AS A MODEL FOR HUMAN NEURODEGENERATIVE DISEASE*. Annual Review of Genetics, 2005. **39**(1): p. 153-171.
83. Parker, J.A., et al., *Genetic and pharmacological suppression of polyglutamine-dependent neuronal dysfunction in Caenorhabditis elegans*. J Mol Neurosci, 2004. **23**(1-2): p. 61-8.
84. Yamada, M., et al., *CAG repeat disorder models and human neuropathology: similarities and differences*. Acta Neuropathol, 2008. **115**(1): p. 71-86.
85. Marsh, J.L., et al., *Expanded polyglutamine peptides alone are intrinsically cytotoxic and cause neurodegeneration in Drosophila*. Hum Mol Genet, 2000. **9**(1): p. 13-25.
86. Kazemi-Esfarjani, P. and S. Benzer, *Genetic suppression of polyglutamine toxicity in Drosophila*. Science, 2000. **287**(5459): p. 1837-40.

87. Warrick, J.M., et al., *Ataxin-3 Suppresses Polyglutamine Neurodegeneration in Drosophila by a Ubiquitin-Associated Mechanism*. *Molecular Cell*, 2005. **18**(1): p. 37-48.
88. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. *Methods*, 2001. **25**(4): p. 402-8.
89. Haacke, A., et al., *Proteolytic cleavage of polyglutamine-expanded ataxin-3 is critical for aggregation and sequestration of non-expanded ataxin-3*. *Hum Mol Genet*, 2006. **15**(4): p. 555-68.
90. Teixeira-Castro, A., et al., *Neuron-specific proteotoxicity of mutant ataxin-3 in C. elegans: rescue by the DAF-16 and HSF-1 pathways*. *Human Molecular Genetics*, 2011. **20**(15): p. 2996-3009.
91. Marsh, J.L., et al., *Expanded polyglutamine peptides alone are intrinsically cytotoxic and cause neurodegeneration in Drosophila*. *Human Molecular Genetics*, 2000. **9**(1): p. 13-25.
92. Zu, T., et al., *Non-ATG-initiated translation directed by microsatellite expansions*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **108**(1): p. 260-265.
93. Muldoon-Jacobs, K.L. and J.D. Dinman, *Specific effects of ribosome-tethered molecular chaperones on programmed -1 ribosomal frameshifting*. *Eukaryot Cell*, 2006. **5**(4): p. 762-70.
94. Plant, E.P. and J.D. Dinman, *Torsional restraint: a new twist on frameshifting pseudoknots*. *Nucleic Acids Res*, 2005. **33**(6): p. 1825-33.
95. Hartz, D., et al., *Extension inhibition analysis of translation initiation complexes*. *Methods Enzymol*, 1988. **164**: p. 419-25.
96. Gould, P.S., H. Bird, and A.J. Easton, *Translation toeprinting assays using fluorescently labeled primers and capillary electrophoresis*. *Biotechniques*, 2005. **38**(3): p. 397-400.
97. Barak, Z., D. Lindsley, and J. Gallant, *On the Mechanism of Leftward Frameshifting at Several Hungry Codons*. *Journal of Molecular Biology*, 1996. **256**(4): p. 676-684.
98. Herr, A.J., et al., *Factors That Influence Selection of Coding Resumption Sites in Translational Bypassing*. *Journal of Biological Chemistry*, 2004. **279**(12): p. 11081-11087.
99. Atkins, J.F., et al., *Normal tRNAs promote ribosomal frameshifting*. *Cell*, 1979. **18**(4): p. 1119-1131.